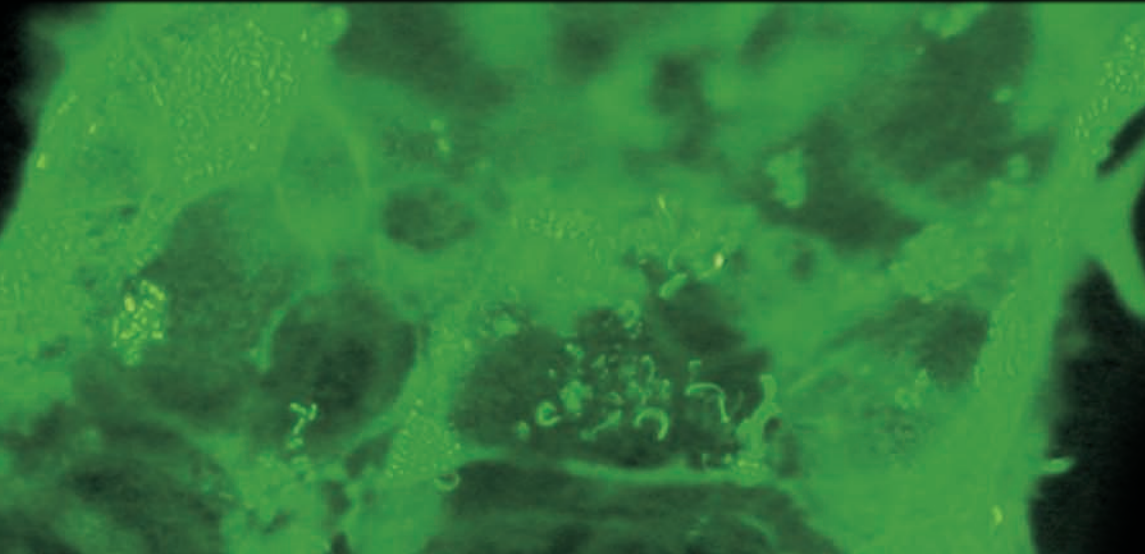


**SHIGATOXIN-SPEZIFISCHE IMMUNGLOBULINE UND
AUSSCHIEDUNG VON SHIGATOXIN-BILDENDEN
ESCHERICHIA COLI BEI KÄLBERN**

JULIA FRÖHLICH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. med. vet. C. Menge

**SHIGATOXIN-SPEZIFISCHE
IMMUNGLOBULINE UND AUSSCHIEDUNG
VON SHIGATOXIN-BILDENDEN
ESCHERICHIA COLI BEI KÄLBERN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Julia Fröhlich
Tierärztin aus Suhl

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

PD Dr. C. Menge

Prof. Dr. K. Doll

Tag der Disputation:

27.01.2009

für Thomas

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J. Fröhlich, G. Baljer, C. Menge* (2007): Untersuchungen zur Kinetik Shigatoxin-spezifischer Antikörpertiter beim Kalb. Posterpräsentation, 27. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 12.-14.03.07, Berlin.

J. Fröhlich, G. Baljer, C. Menge* (2007): Untersuchungen zum Einfluss des Shigatoxin-Antikörpertiters auf die STEC-Ausscheidung bei Kälbern. Vortrag, II. EHEC-Workshop des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 09-11.05.07, Wildbad Kreuth.

J. Fröhlich*, G. Baljer, C. Menge (2007): Shiga toxin-specific immunity and STEC-shedding in naturally infected calves. Vortrag, 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 30.09.-04.10.07, Göttingen; Abstract in Int.J.Med.Microbiol. 297 S1:60.

J. Fröhlich*, S. Barth, G. Baljer, C. Menge (2008):

Untersuchungen zur Klonalität und zum Virulenzprofil Shigatoxin-bildender *E. coli* in einer Kohorte natürlich infizierter Kälber. Poster, Fachgruppentagung DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 25. – 27. Juni 2008, Braunschweig; Abstract in Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 121 (11-12):396..

J. Fröhlich*, G. Baljer, C. Menge (2008):

Shigatoxin-spezifische Immunität und STEC-Ausscheidung bei natürlich infizierten Kälbern. Vortrag, Fachgruppentagung DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie“, 25. - 27. Juni 2008, Braunschweig; Abstract in Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 121 (11-12):390.

J. Fröhlich*, S. Barth, G. Baljer, C. Menge (2008):

Clonal diversity and virulence pattern of Shiga toxin-producing *E. coli* in a cohort of naturally infected calves. Poster, 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 21.09.-24.09.08, Dresden; Abstract in Int.J.Med.Microbiol. 298 S2:91.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert im Rahmen des Graduiertenkolleges 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ sowie des Sonderforschungsbereiches SFB 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“.

I Inhalt

I	Inhalt	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
III	Einleitung	1
IV	Literaturübersicht	2
1	Definition und Wirtsspektrum Shigatoxin-bildender <i>Escherichia coli</i> (STEC)	2
2	Virulenzfaktoren der STEC	3
2.1	Shigatoxine (Stx)	3
2.2	Intimin und Typ III Sekretionssystem.....	8
2.3	Enterohämolysin	9
3	STEC-Infektionen beim Rind.....	10
3.1	Prävalenz von STEC	10
3.2	Symptomatik boviner STEC-Infektionen.....	14
3.3	Epidemiologie der STEC in der Rinderpopulation	15
3.3.1	Erstinfektion und STEC-Ausscheidung in verschiedenen Lebensabschnitten	15
3.3.2	Intermittierende Ausscheidung von STEC und „Supershedder“	16
3.3.3	Dauer der STEC-Ausscheidung	18
3.3.4	Serotypen-spezifische STEC-Ausscheidung	20
4	STEC-spezifische Immunität beim Rind	21
4.1	Humorale Immunität	21
4.1.1	O-Antigene	28
4.1.2	Stx	30
4.1.3	Weitere STEC-Antigene	32
4.1.4	Protektivität einer humoralen STEC-Immunität	34
4.2	Zelluläre Immunität und ihre mögliche Bedeutung	35
5	Antigen-unspezifische Immunmodulation durch STEC-Faktoren	36
5.1	Lymphostatin	36
5.2	Stx	38
V	Material und Methoden	40

1	Probengewinnung	40
1.1	Betriebsdaten	40
1.2	Entnahmezeitpunkte und Probenplan	41
1.2.1	Muttertiere	41
1.2.2	Kälber	41
1.2.3	Weitere Tiere	42
1.3	Probenentnahme	42
1.3.1	Blutproben zur Serumgewinnung	42
1.3.2	Kolostrum	43
1.3.3	Milch	43
1.3.4	Kot	43
1.4	Probenaufbereitung	43
1.4.1	Gewinnung von Serum aus Blutproben	43
1.4.2	Verarbeitung von Kolostrum- und Milchproben	43
2	Zellkulturmethoden	44
2.1	Zelllinien	44
2.2	Gewinnung und Kultivierung von primären, bovinen Kolonkryptenzellen	45
3	Nachweis von Stx-spezifischen Antikörpern in Serum-, Kolostrum- und Milchproben	47
3.1	Verozelltest	47
3.1.1	Prinzip des Neutralisationstestes	47
3.1.2	Prinzip des Zytotoxizitätstestes	49
3.1.3	Auswertung	50
3.1.4	Berechnung der verozytotoxischen/inhibitorischen Dosis 50 %	51
3.1.4.1	Berechnung der verozytotoxischen Dosis 50 %	51
3.1.4.2	Berechnung der inhibitorischen Dosis 50 %	54
3.1.4.3	Nachweisgrenze sowie Definition von Titerabfall und Titeranstieg	54
3.2	ELISA	55
3.2.1	Durchführung des Stx-ELISA	55
3.2.2	Herstellung von <i>E. coli</i> -Ultraschall-Lysaten	56
3.2.3	Überprüfung und Einstellung der Ultraschall-Lysate	57
3.2.4	Durchführung des kompetitiven ELISA	58
3.3	Western Blot und Immunofärbung	60
3.3.1	Tricine-SDS-PAGE	60
3.3.2	Überprüfung des verwendeten Stx1	61
3.3.3	Semi-Dry Western Blot	62
3.3.4	Immunofärbung	63
3.3.4.1	Einstellung der Primär- und Sekundäntikörper-Konzentrationen	63
4	Nachweis der STEC-Ausscheidung	64

4.1	Nachweis von Stx-Genen in Kotproben.....	64
4.1.1	Probenaufbereitung	64
4.1.2	<i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR.....	65
4.1.3	Bestimmung der Nachweisgrenze für die <i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR.....	66
4.1.4	<i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs.....	69
4.1.5	Bestimmung der Nachweisgrenze für die <i>stx2/stx2c</i> -Typisierungs-PCR.....	71
4.2	Nachweis von Stx im Kot	72
5	Isolierung und Charakterisierung von STEC-Stämmen.....	73
5.1	Anzuchtverfahren.....	73
5.2	Typisierung der STEC	73
5.2.1	<i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR und <i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs	73
5.2.2	Multiplex-PCR für <i>stx</i> , <i>ehxA</i> , <i>eae</i>	73
5.2.3	Intimin-Typisierungs-PCR.....	75
5.2.4	Wachstum auf Selektivagar.....	75
5.2.5	Überprüfung der <i>in vitro</i> -Stx-Bildung.....	75
5.2.6	Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)	76
5.3	Bindungsversuche im Zellkulturmodell (Adhäsionstests).....	79
5.3.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	79
5.3.2	Anzucht der Bakterien.....	79
5.3.3	Fluorescence Actin Staining-Test (FAS-Test)	80
5.3.4	Giemsa-Test	82
5.3.5	Nachweis von Stx in Zellkulturüberständen.....	83
VI	Ergebnisse	85
1	Nachweis von Stx-spezifischen Antikörpern in Serum-, Kolostrum- und Milchproben	85
1.1	Verozell-Neutralisationstest.....	85
1.1.1	Stx1-spezifische Antikörper.....	85
1.1.1.1	Serum, Kolostrum und Milch der Muttertiere	85
1.1.1.2	Serum der Kälber.....	88
1.1.1.3	Serum weiterer Tiere	91
1.1.2	Stx2-spezifische Antikörper.....	92
1.1.2.1	Serum, Kolostrum und Milch der Muttertiere	92
1.1.2.2	Serum der Kälber.....	92
1.1.2.3	Serum weiterer Tiere	94
1.1.3	Stx2c-spezifische Antikörper	94
1.2	Kompetitiver ELISA	94
1.2.1	Stx1-spezifische Antikörper.....	94
1.2.2	Stx2-spezifische Antikörper.....	95
1.2.3	Stx2c-spezifische Antikörper	96

1.3	Western Blot/Immunofärbung	97
1.3.1	Stx1-spezifische Antikörper	97
2	Nachweis der STEC-Ausscheidung	100
2.1	Kotuntersuchungen mittels PCR	100
2.1.1	<i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR	100
2.1.2	<i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs	104
2.2	Nachweis von Stx im Kot	109
3	Isolierung und Charakterisierung von bovinen STEC-Stämmen	109
3.1	Typisierung der isolierten Stämme	109
3.1.1	Charakterisierung des Makrorestriktionsmusters via PFGE-Analyse	112
3.1.2	Bestimmung des Intimin-Subtyps	113
3.2	Bindungsversuche im Zellkulturmodell	113
3.2.1	Bindungsversuche mit HEp2(Clone2b)-Zellen	114
3.2.1.1	FAS-Test	114
3.2.1.2	Giemsa-Test	115
3.2.2	Bindungsversuche mit bovinen Kolonkryptenzellen	117
3.2.2.1	FAS-Test	117
3.2.2.2	Giemsa-Adhäsionstest	118
3.2.2.3	Nachweis von Stx in Zellkulturüberständen	120
VII	Diskussion	122
VIII	Zusammenfassung	136
IX	Summary	138
X	Literaturverzeichnis	140
XI	Anhang	161
1	Übersicht untersuchte Tiere	161
2	Stx-spezifische Antikörper, Verozell-Neutralisationstest und kompetitiver ELISA, einzelne Titerwerte	165
3	Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	172
4	Verwendete Puffer und Medien	179
4.1	Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturtechniken	179

4.2	Puffer und Lösungen für den ELISA	183
4.3	Puffer und Lösungen für die Tricine-PAGE	184
4.4	Puffer und Lösungen für Western Blot und Immunofärbung	185
4.5	Puffer und Lösungen für CHEF-PFGE	187
4.6	Puffer und Lösungen für PCRs	189
4.7	Kulturmedien für die Bakterienanzucht	189
 XII Abbildungsverzeichnis		191
1	Abbildungen	191
2	Tabellen	192

II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µJoule	Mikrojoule
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
<i>A.dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
a. p.	<i>ante partum</i> , vor der Abkalbung
A/E	<i>attaching/effacing</i>
AA	aggregative Adhäsion
Abb.	Abbildung
abs	absolut
ad	bis zu (auffüllen auf)
Apr	April
AS	Amidoschwarz
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Aug	August
bp	<i>baise pairs</i> , Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD ₅₀	zytotoxische Dosis 50 %
CHEF	<i>contour clamped homogeneous electric field</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Ceffexime-Tellurit
d	Tag
DA	diffuse Adhäsion
Dez	Dezember
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s-Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	Strukturgen des Intimin
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
Efa	<i>EHEC factor for adherence</i>
<i>efa-1</i>	Strukturgen für Efa-1
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EHEC-HlyA	EHEC-Hämolysin
Ehly	Enterohämolysin
<i>ehxA</i>	Strukturgen des EHEC-Hämolysin/Enterohämolysin
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
Esc	<i>E. coli secretion apparatus</i>

Esp	<i>E. coli secreted protein</i>
f.c.	<i>final concentration</i> , Endkonzentration
Fa.	Firma
FAS	<i>Fluorescence Actin Staining</i>
Feb	Februar
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gb3	Globotriaosylzeramid
Gb4	Globotetraosylzeramid
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank`s Buffered Salt Solution</i>
HC	Hämorrhagische Colitis
HEp	humanes Larynxkarzinom-Epithel
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HRP	<i>Horseraddish Peroxidase</i>
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
ID	Inokulationsdosis
ID50	inhibitorische Dosis 50 %
IE	internationale Einheit
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IHOD	Inhibitorische optische Dichte
IL	Interleukin
Int	Intimin
Jan	Januar
Jul	Juli
Jun	Juni
k.A.	keine Angaben
kB	Kilobasen
KbE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LA	lokale Adhäsion
LB-Medium	Louria Bertani-Medium
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
lfd. Nr.	laufende Nummer
lifA	Strukturgen für Lymphostatin
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LW	Lebenswoche
m	männlich
M	Molarität
mA	Milliampere
MAT	Milchaustauscher
MeOH	Methanol
mg	Milligramm

min	Minute
MK	Mediumkontrolle
ml	Milliliter
mLT	mutagenisiertes hitzelabiles Enterotoxin
mM	millimolar
MM	Molekularmassenstandard
mm	Millimeter
Mon	Monat
Mrz	März
MT	Muttertier
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.n.	nicht nachweisbar
n.t.	nicht typisierbar
n.u.	nicht untersucht
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
nm	Nanometer
Nov	November
Nr.	Nummer
NT	Neutralisationstest
OD	optische Dichte
OG	Obergrenze
Okt	Oktober
p. n.	lat. <i>post natum</i> nach der Geburt
p. p.	lat. <i>post partum</i> , nach der Abkalbung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pM	pikomolar
pmol	Pikomol
pos	positiv
rel	relativ
REPEC	<i>rabbit EPEC</i> (enteropathogene <i>Escherichia coli</i>)
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde
Sep	September
SF	Sorbitol fermentierend
SMAC	Sorbitol MacConkey
STEC	Shigatoxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoxin
stx	Strukturgen des Stx
Stx1A	A-Untereinheit von Stx1
Stx1Ak	Stx1-spezifische, neutralisierende Antikörper
Stx1B	B-Untereinheit von Stx1
Stx2Ak	Stx2-spezifische, neutralisierende Antikörper

StxA	A-Untereinheit von Stx
StxB	B-Untereinheit von Stx
syn	synonym
T3SS	Typ III Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- EDTA
TE	Tris EDTA
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
Tir	<i>translocated intimin receptor</i> , translozierter Intiminrezeptor
TLR	„Toll-like“ Rezeptor
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
toxB	Strukturgen auf dem <i>E. coli</i> Plasmid O157, ähnlich <i>efa</i>
TPP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSB	Tris Borat EDTA
U	Umdrehungen
U	<i>unit</i> , Einheit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen je Minute
UE	Untereinheit
UG	Untergrenze
UV	ultraviolett
V	Volt
v:v	Volumeneinheit
Vero-NT	Verozell-Neutralisationstest
Vero-ZT	Verozell-Zytotoxizitätstest
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
w	weiblich
W	Wochen
WP	Waschpuffer
z.T.	zum Teil

III Einleitung

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) sind Zoonoseerreger und verursachen beim Menschen Erkrankungen mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie hämorrhagische Colitis (HC), hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) oder thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TPP) (121).

Bei Rindern, die weltweit das wichtigste Reservoir für STEC darstellen, verlaufen STEC-Infektionen in der Regel asymptomatisch aber persistierend. Die Tiere infizieren sich bereits in den ersten Lebenswochen und scheiden zu einem hohen Prozentsatz den Erreger über einen längeren Zeitraum aus (23, 24, 301, 307, 320). Versuche, die STEC-Ausscheidung bei Rindern durch Maßnahmen bezüglich der Aufstallung, der Fütterung, des Transportmanagements oder durch Vakzinierung zu reduzieren, zeigten bislang nur mäßigen Erfolg (39, 89, 92, 222, 254, 265, 284, 285, 292, 319, 321).

Die Persistenz der STEC-Infektion wird vermutlich durch die Bildung von Shigatoxinen (Stx) begünstigt. So bindet Stx1 an Rezeptoren, die von peripheren (161, 260) und intraepithelialen Lymphozyten (163) in frühen Aktivierungsstadien exprimiert werden (260). Stx1 blockiert die Proliferation verschiedener Subpopulationen (CD8 α^+ T-Zellen, B-Zellen) *in vitro* (165). *In vivo* verzögert Stx bei Kälbern die Entwicklung einer STEC-spezifischen zellulären Immunität (101). Obwohl bei natürlich infizierten adulten Tieren Stx-spezifische Antikörper im Serum und Kolostrum regelmäßig nachweisbar sind (116, 220), konnte die Ausbildung einer spezifischen humoralen Immunität mit Induktion Stx-spezifischer Serumantikörper im Rahmen experimenteller STEC-Infektionen von Kälbern nur selten nachgewiesen werden (101, 116). Dies könnte bedeuten, dass Kälber auch unter Feldbedingungen zum Zeitpunkt der STEC-Erstinfektion nicht oder nur unzureichend vor der Wirkung des Stx geschützt sind. In der vorgelegten Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die bei adulten Tieren nachweisbaren Stx-spezifischen Antikörper via Kolostrum auf neugeborene Kälber übertragen werden und wie sich die humorale Stx-Immunität bei Kälbern relativ zum Zeitpunkt der Erstinfektion mit STEC entwickelt.

IV Literaturübersicht

1 Definition und Wirtsspektrum Shigatoxin-bildender *Escherichia coli* (STEC)

Bakterien der Spezies *Escherichia coli* sind ein Bestandteil der normalen mikrobiellen Darmflora bei Säugern und Vögeln. Dennoch gibt es Stämme, die mit gastrointestinalen Krankheiten sowohl beim Menschen als auch beim Tier assoziiert werden. Solche *E. coli*-Stämme werden gemäß ihrer Virulenzeigenschaften in unterschiedliche Pathogenitätsgruppen oder sogenannte Pathovaren eingeteilt (177). Die Stämme einer dieser Pathovaren sind durch die Produktion eines potenten Zytotoxins gekennzeichnet, welches die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen inhibiert und somit irreversible Zellschäden verursacht. Diese Toxine werden aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung gegenüber Verozellen Vero(zyto)toxine (VT) oder entsprechend ihrer Ähnlichkeit mit dem von *Shigella dysenteriae* produzierten Toxin Shigatoxinen (Stx) genannt (157). Die entsprechenden Stämme werden als VT-bildende *E. coli* (VTEC) oder aber als Stx-bildende *E. coli* (STEC) bezeichnet.

Obwohl STEC bei vielen Arten von Haus- und Wildtieren nachgewiesen werden konnten, traten sie als Krankheitserreger bisher ausschließlich bei jungen Kälbern (Durchfallerkrankungen), bei Absetzferkeln (Ödemkrankheit) und Hunden (kutane und renale Vaskulopathie der Greyhounds) in Erscheinung (304).

STEC-Infektionen des Menschen kommen zwar selten vor, im Krankheitsverlauf können aber schwerwiegende Komplikationen wie hämorrhagische Colitis (HC), hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) oder thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TPP), vor allem bei Kindern, älteren Personen, Schwangeren, Kranken und immunsupprimierten Menschen auftreten (15). STEC-Stämme, welche nachweislich HC oder HUS beim Menschen verursacht haben, werden als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet (140). Der Serotyp O157:H7 erlangte in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung. Erstmals 1982 als Ursache einer STEC-Lebensmittelinfektion durch ungenügend erhitztes Rindfleisch nachgewiesen (229), zeigt sich dieser Serotyp bis heute für einen Großteil der schweren humanen Erkrankungen in den westlichen Industrienationen verantwortlich. Daneben treten vor allem auf dem europäischen Festland auch eine Reihe von so genannten non-O157-EHEC-Stämmen aus den Serogruppen O111, O26, O145, O103 als Auslöser von HC und HUS in Erscheinung (86). Neben den genannten Serotypen werden zunehmend auch hochvirulente

Isolate weiterer Serogruppen beschrieben. Dazu gehören u.a. O118- und O121-positive Stämme sowie sorbitol-fermentierende (SF) O157-Stämme (SF O157:H⁻) (120, 148, 279).

Bis heute wurden zahlreiche Übertragungswege für STEC-Infektionen des Menschen beschrieben. Dazu gehören vor allem der Verzehr von mit Rinderkot kontaminierten Lebensmitteln, der direkte Kontakt zu Rindern, Rinderkot oder mit Rinderkot verschmutzten Gewässern sowie der Kontakt zu bereits erkrankten Personen (45). Obwohl auch andere Wiederkäuer wie Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer sowie gelegentlich weitere Säuger und Vögel als Quelle humaner Infektionen beschrieben wurden, stellen Rinderbestände weltweit das Hauptreservoir für STEC dar (45). Die Verminderung des STEC-Infektionsrisikos des Menschen durch eine Kontrolle, Reduktion oder Vermeidung der STEC-Ausscheidung beim Rind stellt bis heute ein wesentliches Ziel bei der Bekämpfung humaner STEC-Infektionen dar.

2 Virulenzfaktoren der STEC

2.1 Shigatoxine (Stx)

Stx werden als Hauptvirulenzfaktoren der STEC angesehen (45). Die genetische Information für die Produktion von Stx ist auf dem Genom temperenter lambdoider Prophagen kodiert, welche in das STEC-Chromosom integriert sind (241). Ein STEC-Stamm kann mehrere *stx*-Prophagen gleichzeitig beherbergen und ist somit befähigt, verschiedene Toxinvarianten zu produzieren. *Stx*-Phagen können nach Induktion in den lytischen Zyklus eintreten. Freie Phagen sind anschließend in der Lage, weitere Bakterien zu infizieren und Stx-Gene via horizontalem Gentransfer an weitere *E. coli*-Stämme aber auch andere Enterobacteriaceae-Spezies wie *Citrobacter freundii* oder *Enterobacter cloacae* weiterzugeben (96, 157).

Shigatoxine sind heteromere 70 Kilodalton (kDa) große Proteine und bestehen aus einer aktiven A (StxA-, 32 kDa)- und fünf rezeptorbindenden B (StxB-, 7,7 kDa)- Untereinheiten (UE) (162, 188). Als funktioneller Rezeptor für Stx fungiert das neutrale Glykosphingolipid Globotriaosylceramid (Gb₃) oder CD77 (144); für die Stx-Variante Stx2e konnte Globotetraosylceramid (Gb₄) als Rezeptor identifiziert werden (233). Die Zytotoxizität von Stx auf Zielzellen beruht im Wesentlichen auf der rezeptorvermittelten Endozytose des Holotoxins, dessen Transfer zum Trans-Golgi-Apparat sowie dem anschließenden retrograden Transport zum Endoplasmatischen Retikulum. Dort wird die aktive StxA-UE in das Zytosol

geschleust und entfaltet ihre zytotoxische Wirkung durch Zerstörung ribosomaler RNA mit nachfolgender Hemmung der Proteinbiosynthese (143, 162, 236).

Es existieren zwei Stx-Hauptgruppen, die Stx1- und die Stx2-Gruppe (190). Das von STEC produzierte Stx1 ist genetisch und antigenetisch nahezu identisch zu *Shigella dysenteriae*-Toxin Typ 1 (190) und unterscheidet sich von diesem in nur einer einzigen Aminosäure (272). Stx2 und Stx1 unterscheiden sich dagegen sowohl genetisch als auch in ihren antigenetischen Eigenschaften. So sind nur etwa 56 % der Aminosäuren beider Toxine homolog zueinander (110) und die Verozell-zytotoxische Aktivität beider Toxine kann nicht durch heterologe Seren neutralisiert werden (95, 121, 190, 192, 214, 250, 274).

Die Stx2-Gruppe zeichnet sich durch ihre genetische und antigenetische Heterogenität aus. Mittlerweile sind zahlreiche Varianten des ursprünglich beschriebenen Stx2 aus dem EHEC O157:H7-Stamm EDL933 (274) bekannt. Tab. 1 gibt einen Überblick über die bisher beschriebenen Stx2-Varianten und verdeutlicht gleichzeitig die Schwierigkeiten, die sich durch die unterschiedliche Nomenklatur der Subtypen, welche sich in den vergangenen Jahren mehrfach änderte, ergeben. So existieren heute Gruppen von Stx2-Varianten, in denen zum Teil mehrere Typen älterer Nomenklatur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz zusammengefasst wurden (Stx2c, Stx2d (aktivierbar) und Stx2d (nicht aktivierbar)).

Stx2-bildende STEC sind, anders als Stx1-Produzenten, häufiger mit schweren Komplikationen infolge humaner EHEC-Infektionen assoziiert und es besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Nachweis bestimmter Stx2-Gensequenzen und dem Risiko, im Verlaufe einer EHEC-Infektion HUS zu entwickeln (29, 203). Neben Stx2 wird die Variante Stx2c ebenfalls häufig bei klinischen EHEC-Isolaten angetroffen (77). Stx2 und Stx2c sind auch die in der Rinderpopulation am häufigsten nachgewiesenen Stx2-Varianten (37, 84, 149). Der Typ Stx2d kommt ebenfalls bei Mensch und Wiederkäuer vor, ist aber insgesamt weitaus seltener nachweisbar (225). Es werden zwei Stx2d-Gruppen unterschieden:

Zum einen werden STEC-Isolate nachgewiesen, welche den Typ Stx2d-aktivierbar (Stx2d1 und Stx2d2) nach Melton-Celsa *et al.* tragen (157). Als Aktivierung des Toxins bezeichnet man dessen um den Faktor 10 bis 1000 gesteigerte Verozell-Zytotoxizität nach Vorinkubation mit humanem oder murinem Darm-Mukus (158). Ursache hierfür ist die Spaltung der A2-Untereinheit des Toxins durch das Mukusenzym Elastase, wodurch ein aktiverer Toxintyp entsteht (159). Die Variante Stx2d-aktivierbar ist in erster Linie bei bovinen Isolaten nachweisbar (84). Die Toxinvariante Stx2d nach Piérard *et al.* (Stx2d-Ount, Stx2d-OX3a und Stx2d-O111) (217) welche entsprechend als Stx2d-nicht aktivierbar bezeichnet wird, kommt

dagegen hauptsächlich bei STEC-Isolaten ovinen Ursprungs oder bei STEC-Isolaten aus asymptomatischen oder milden Krankheitsverläufen humaner STEC-Infektionen vor (77, 84, 225).

Die Variante Stx2e ist typischerweise mit der Ödemkrankheit der Schweine assoziiert und wird nur äußerst selten bei STEC-Isolaten von anderen Tierarten oder dem Menschen detektiert (202, 216, 218, 282, 299). Beim Menschen werden die Varianten Stx2d und Stx2e nur vereinzelt mit schweren Verlaufsformen von EHEC-Infektionen in Verbindung gebracht (77, 210, 225, 282), können aber gelegentlich bei unkomplizierten STEC-Infektionen mit milder Diarrhöe sowie bei asymptomatischen Personen detektiert werden (77, 262). Stx2f wurde wiederholt in STEC-Stämmen identifiziert, welche bei Tauben isoliert wurden (244). Beim Menschen ist bisher nur ein einziges Isolat beschrieben, dessen *stx2*-Variante >99 % Sequenzhomologie zu *stx2f* aufweist (79, 244). Allgemein weniger Informationen gibt es über die erst in jüngerer Zeit beschriebenen Stx2-Varianten. Das Toxin Stx2-NV206 wurde bei 23 Isolaten erstmals in einer französischen Studie beschrieben (11). Über die Verbreitung dieser Stx2-Variante in anderen geographischen Regionen gibt es keine Informationen. Stx2g konnte erstmals 2003 bei einem STEC-Isolat aus einer Rinderkotprobe detektiert werden. Die Autoren berichten, dass seine Nukleotidsequenz derjenigen der Stx2-Varianten *stx2*, *stx2c* und *stx2d* ähnlich sei. Stx2g-Gene konnten bislang nur gelegentlich bei STEC von Rindern nachgewiesen werden (81, 139, 294).

Tab. 1: Stx2-Varianten, Nomenklatur und Referenzstämme

Stx2-Variante ¹⁾	Referenz- stamm	Serotyp	NSH <i>stx2</i> (%) ²⁾		Quelle	Ref.	Bemerkung
			A-UE	B-UE			
Stx2 (Stx2-EDL933)	EDL933	O157:H7	100	100	M, HUS	(274)	
Stx2c	E32511	O157:H-	99,7	95,2	M, HUS	(245)	
Stx2vh-c	7279	O157:H7	99	95		(168)	
Stx2va	H.I.8	O128:B12	69,5	78,1	M, D	(79)	nach (244) zu Stx2f
Stx2vh (Stx2vh-a, Stx2vh-b)	B2F1	O91:H21	98,6 ³⁾	95,5 ³⁾	M, HUS	(108)	umbenannt Stx2d (Stx2d1, Stx2d2) (157, 160)
Stx2d (aktivierbar) (Stx2d1, Stx2d2)	B2F1		siehe Stx2vh			(160)	miteinbezogen Stx2vh-a/Stx2vh-b (108)
Stx2d (Stx2d-Ount/-O111/-OX3a)	EH250		94,9 ⁴⁾	86,6 ⁴⁾	M, A	(217)	miteinbezogen Stx2d-OX3a/-O111, (209, 210)
Stx2e	S1191	O139	94	79	ED	(299)	vorher SLT-IIv
Stx2f	T4/97	O128:H2	63,4	75,4	Taube	(244)	miteinbezogen Stx2va
Stx2-NV206	NV206	O6:H10	94-99 ⁵⁾	81-96 ⁵⁾	Rind	(11)	
Stx2g	7v	O2:H25	63-99 ⁵⁾	76-90 ⁵⁾	Rind	(139)	

Erläuterungen: 1): Shigatoxin (Stx)-Nomenklatur einheitlich angewandt, ursprüngliche Publikationen teilweise als Verotoxin (VT) oder Shiga-like-Toxin (SLT); 2): Nukleotidsequenzhomologie zu *stx2*; **3)** für Variante Stx2vh-a; **4)** nach Friedrich *et al.* (77); **5)** bezogen auf Stx2 und Stx2-Varianten; **A:** Abdominalkrämpfe; **D:** Diarrhoe; **ED:** Edema disease, Ödemkrankheit der Schweine; **M:** Mensch; **Ref.:** Referenz.

Innerhalb der Stx2-Gruppe wurden bereits früh antigenetische Unterschiede zwischen den einzelnen Stx2-Varianten festgestellt (95, 214, 245). Diese Variabilität könnte in erster Linie durch die Sequenzunterschiede innerhalb der entsprechenden StxB-UE verursacht sein (168, 245), welche prominenter sind als die Sequenzunterschiede zwischen den A-Untereinheiten der Stx2-Varianten (Tab. 1).

Monoklonale Antikörper (65, 214) gegen die StxA- oder StxB-UE von Stx2 neutralisierten die zytotoxische Aktivität von Stx2c wesentlich effizienter als diejenige von Stx2 selbst (245). Eine bessere Neutralisationsaktivität von Stx2c-spezifischen im Vergleich zu Stx2-spezifischen Antikörpern für die Toxine Stx2 und Stx2c beschreiben Tyler *et al.* (288). Monoklonale Antikörper gegen die Stx2A-UE konnten Stx2e nicht neutralisieren (214). Polyklonale Seren gegen Stx2 zeigten eine geringere Neutralisationseffizienz gegenüber Stx2c- oder Stx2e-haltigen Bakterienlysaten als gegenüber Stx2-haltigen Lysaten (245).

Trotz der antigenetischen Variabilität der Stx2-Varianten und der sich daraus ergebenden unterschiedlichen Neutralisationsfähigkeiten gibt es Hinweise darauf, dass Stx2-spezifische Antikörper trotz erheblicher Nukleotidsequenzunterschiede in StxA- und StxB-UE sogar die genetisch weit entfernte Variante Stx2f (Stx2va) neutralisieren (79).

Im Gegensatz zur Stx2-Familie ist die Stx/Stx1-Gruppe homogener. Die Stx1-Gene, die auf den Bakteriophagen H19B, H30 und 933J codiert sind (58, 110, 130), weisen die gleiche Nukleotidsequenz auf und unterscheiden sich nur in drei Nukleotiden bzw. einer Aminosäure der A-Untereinheit von dem *Shigella dysenteriae*-Toxin (Stx) (272). Paton beschreibt drei humane Stämme mit geringfügigen Variationen in der Nukleotidsequenz. Die Toxine unterscheiden sich um eine oder zwei Aminosäuren vom Stx oder dem Stx1 des Phagen 933J, dem Stx1-Prototypen (205, 208). Es wurden auch Varianten mit größeren Abweichungen von diesen Toxinen beschrieben. Dazu gehört eine Stx1-Variante aus ovinen (5, 205) und humanen (318) STEC-Stämmen, welche nun als Stx1c bezeichnet wird (318), sowie eine erstmalig in einem bovinen STEC-Stamm des Serotyps ONT:H19 nachgewiesene Stx1d-Variante (41). Stx1c und Stx1d unterscheiden sich nicht nur in der A- sondern auch in der B-Untereinheit vom 933J-Stx1, wobei die Homologie zu dessen Untereinheiten noch bei über 90 % liegt (97,1 % für die Stx1cA-, 96,6 % für die Stx1cB-UE; 93 % bzw. 92 % für die A- und B-UE von Stx1d) (41, 318).

Neben *Shigella dysenteriae* und *Escherichia coli* produzieren noch weitere Bakterienspezies Stx-ähnliche Toxine. Es gibt zahlreiche Berichte über Bakterientoxine, die sich ebenfalls

durch ihre Zytotoxizität gegenüber Vero- oder Hela-Zellen auszeichnen und die durch Stx-spezifische Antiseren neutralisierbar sind. Dazu gehören Toxine von *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera* (187), *Salmonella typhimurium* (187, 273) und *Campylobacter jejuni* (188). Eine genauere Untersuchung einschließlich Sequenzierung solcher Toxine wurde für *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* vorgenommen. Das von *C. freundii* produzierte Toxin SLT-IIc zeigt in seinen Untereinheiten SLT-IIcA und SLT-IIcB eine große Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zu den A- und B-Untereinheiten der Stx2-Varianten Stx2vhc (99,4/100 %), Stx2c (98,4/100 %) und Stx2 (98,1/96,5 %) (243). Bei *E. cloacae* wurde ebenfalls ein zu Stx2 nah verwandtes Toxin nachgewiesen (SLT-II/ENT), dessen A- und B-Untereinheiten denen von Stx2c bzw. Stx2 ähneln (206).

2.2 Intimin und Typ III Sekretionssystem

Das Protein Intimin kommt außer bei STEC auch bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC) vor und wird von dem chromosomalen Gen *eae* codiert, welches auf der Pathogenitätsinsel LEE („locus of enterocyte effacement“) lokalisiert ist (115, 118). Genprodukte des LEE sind für die enge Anlagerung der STEC an intestinale Epithelzellen verantwortlich. LEE-positive *E. coli* verursachen typischerweise „attaching- und effacing“ (A/E)-Läsionen an der intestinalen Mukosa (118). Die Anheftung erfolgt über die Bindung von Intimin an Tir („translocated intimin receptor“), ebenfalls ein bakterielles Protein, welches mit Hilfe eines LEE-kodierten Typ III Sekretionssystems (s.u.) in die Wirtszelle transloziert wird (76, 267). Neben Tir wurden auch β 1-Integrine sowie zelloberflächen-assoziiertes Nucleolin als zelluläre Rezeptoren für Intimin identifiziert (257).

Intimin-positive STEC Stämme sind häufig mit Fällen von HC oder HUS beim Menschen assoziiert (121, 212), weshalb zahlreiche Autoren einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *eae* und der Fähigkeit von STEC-Stämmen zur Auslösung schwerer humaner Erkrankungen sehen (2, 18, 20, 204, 212). Allerdings gibt es auch Berichte, wonach STEC-Infektionen mit schweren Krankheitsverläufen beim Menschen durch *eae*-negative Stämme ausgelöst wurden (211, 212).

Die Bedeutung von Intimin als Kolonisationsfaktor bei bovinen STEC O157:H7-Infektionen konnte für neonatale (62) und abgesetzte Kälber (61, 293) sowie adulte Rinder (54) gezeigt werden. *Eae*-positive STEC scheinen beim Rind auch im Zusammenhang mit Kälberdurchfällen zu stehen. Mehrfach konnten solche Stämme bei durchfallerkrankten Kälbern nach experimentellen und natürlichen STEC-Infektionen isoliert werden (63, 114,

312). Eine höhere Nachweishäufigkeit von *eae* bei STEC von durchfallerkrankten Kälbern verglichen mit Isolaten gesunder Tiere wurde ebenfalls beschrieben (103, 296, 308). Zahlreiche Autoren verweisen zusätzlich auf die häufige Assoziation von *eae* und *stx1* bei bovinen STEC (103, 128, 151, 198, 308).

Mittlerweile wurden 19 Varianten des *eae* identifiziert, die für 19 verschiedene Intimintypen und -subtypen kodieren: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\xi R/\beta 2B$, $\delta/\kappa/\beta 2O$, $\gamma 1$, $\theta/\gamma 2$, $\varepsilon 1$, $\nu R/\varepsilon 2$, ζ , $\eta 1$, $\eta 2$, $\iota 1$, $\mu R/\iota 2$, λ , μB , νB , ξB , o (3).

Das Typ III Sekretionssystem (T3SS) wird aus einer Vielzahl LEE-kodierter Proteine (Esc, „*E. coli* secretion apparatus“) gebildet und vermittelt die Sekretion der LEE-Proteine Esp („*E. coli* secreted protein“)A, EspB, EspD, EspF und Tir in die Wirtszelle (177). Die Sekretion der Esp-Proteine ist essentiell für die Ausbildung von A/E-Läsionen. Man geht davon aus, dass nach Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle („attaching“) LEE-Proteine vermehrt exprimiert werden und es zur Ausbildung eines Translokations-Apparates („translocon“) kommt. Dieser Komplex beinhaltet Poren sowohl in der bakteriellen Außenmembran (EscC-generiert) als auch in der Wirtszellmembran (EspB-generiert). Diese werden wiederum durch EspA-Filamente vereinigt und bilden daraufhin einen kontinuierlichen Tunnel vom Bakterien- zum Wirtszellzytosol. Das Translocon selbst dient zur Sekretion von Tir (syn. EspE) in die Wirtszelle. Nach der Translokation der Effektorproteine in die Wirtszelle erfolgt nach verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden eine Umstrukturierung eukaryotischer Zytoskelettbestandteile, insbesondere eine Akkumulation von Aktinfilamenten unterhalb der bakteriellen Anheftungsstelle. Dies führt schließlich zur Ausbildung so genannter „pedestals“ unterhalb der anhaftenden Bakterien sowie zu einer Zerstörung des Mikrovillisaumes der Wirtszelle („effacement“) (30, 75, 76).

Aufgrund ihrer Beteiligung an der Ausbildung von A/E-Läsionen könnten die durch das T3SS sezernierten Esps, wie Intimin, bedeutend für die Kolonisation von STEC im bovinen Darm sein und stellen deshalb mögliche Vakzinekandidaten bei der Entwicklung von Impfstoffen zur Reduktion der STEC-Prävalenz beim Rind dar (66, 222).

2.3 Enterohämolysin

Das Enterohämolysin (Ehly) syn. EHEC-Hämolysin (EHEC-*HlyA*) wird von dem Gen *ehxA* kodiert (177). Seine pathogenetische Rolle bei bovinen und humanen STEC-Infektionen ist noch nicht endgültig geklärt. Einige Autoren konnten entsprechende Gene mit großer

Häufigkeit bei Isolaten aus HUS/HC-Patienten detektieren (28, 40, 242). Jedoch kommen *ehxA*-positive Stämme mit geringerer Häufigkeit auch bei Isolaten aus Patienten mit milderen Krankheitsverläufen vor (28, 29, 40, 242). Bei Kälbern konnte eine positive Korrelation von *ehxA* und dem Auftreten von Durchfällen in der ersten Lebenswoche gezeigt werden (307).

3 STEC-Infektionen beim Rind

3.1 Prävalenz von STEC

Untersuchungen in Folge humaner STEC-Ausbrüche konnten wiederholt zeigen, dass Rinder das Hauptreservoir für diese Erreger darstellen (45, 179, 200). Ein großer Teil aller epidemiologischen Untersuchungen zur Verbreitung von STEC bei Rindern betrachtet ausschließlich STEC O157:H7-Stämme. Dies ist mit der herausragenden Bedeutung dieses Serotyps als Auslöser humaner STEC-Infektionen in westlichen Industrienationen wie den USA, Kanada, Großbritannien, Irland, Japan und Australien zu erklären. In einigen Regionen, z.B. in Deutschland, erlangten auch non-O157 STEC große Bedeutung als humane Krankheitserreger, so dass es zunehmend auch Prävalenzstudien zum Vorkommen solcher STEC-Stämme beim Rind gibt.

In Europa variieren die in unterschiedlichen Studien ermittelten Prävalenzen erheblich. In Tab. 2 sind nur einige der im europäischen Raum durchgeführten Studien zur STEC-Prävalenz bei Rindern aufgeführt.

Tab. 2: STEC-Prävalenzen bei Rindern in Europa

Quelle	Land	Anzahl untersuchter Proben/Bestände/Tiere	Anzahl pos. (%)	
			<i>E. coli</i> O157:H7	STEC
(298)	D	372 Proben insgesamt 13 Bestände	n.u.	128 (34,4 %) Bestände: 10 (77 %) Tiere: 0-85,7 %
(83)	D	2163 Proben insgesamt 4 Bestände	sporadisch n.u.	970 (44,8 %) Bestände: 4 (100 %) Tiere: 28,8-81,5 %
(227)	D	204 Proben insgesamt	n.n.	97 (47,6 %)
(52)	SRB	824 Proben insgesamt 175 Bestände Kälber (< 4 Mon) Färsen (4-12 Mon) Kühe (> 12 Mon)	n.u.	126 (15,3 %) Bestände: 70 (40 %) 25 (10,7 %) 17 (22,7 %) 84 (16,7 %)
(322)	D	726 Proben insgesamt 103 Bestände	n.n.	131 (18,0 %) Bestände: 51 (49,5 %)
(24)	E	19 Bestände 90 Kälber 268 Kühe	n.n.	Bestände: 18 (95 %) Tiere: 0-100 % 33 (37 %) 93 (35 %)
(97)	NL	10 Bestände 60 Kälber (< 4 Mon) 137 Kälber (4-12 Mon) 135 Färsen (1-2 Jahre) 134 Kühe (2-3 Jahre) 318 Kühe (> 3 Jahre)	Bestände: 7 (70 %) Tiere: 0,8-22,4 % 4 (6,7 %) 29 (21,7 %) 5 (3,7 %) 3 (2,2 %) 34 (10,7 %)	n.u.
(276)	GB	9256 Proben insgesamt 32 Bestände	392 (4,2 %) 14 (70 %)	n.u.

Erläuterungen: **D:** Deutschland; **E:** Spanien; **GB:** Großbritannien; **Mon:** Monate; **n.n.:** nicht nachweisbar; **n.u.:** nicht untersucht; **NL:** Niederlande; **pos:** positiv; **SRB:** Serbien.

Auffällig ist dabei, dass bei der Untersuchung mehrerer Tierbestände der Anteil STEC-positiver Herden in allen Untersuchungen sehr hoch ist. Die Herdenprävalenz liegt sowohl für STEC O157:H7 als auch für non-O157 STEC unabhängig von der geographischen Region in den meisten Studien bei über 50 % (97, 276, 298). Mit effektiven STEC-Nachweis- und Isolationsmethoden ist es möglich, in zahlreichen Rinderbeständen wenigstens bei einem Tier oder zu einem Zeitpunkt STEC nachzuweisen (24, 83, 97).

Der Anteil STEC-positiver Einzeltiere einer Herde dagegen ist höchst variabel. Die STEC-Einzeltierprävalenz kann 0-100 % aller untersuchten Tiere betragen (24, 83, 97, 298).

Auffällige Unterschiede der STEC-Prävalenz ergeben sich nicht nur im Vergleich zwischen Einzeltier und Herde, sondern auch wenn weitere epidemiologische Einflussfaktoren erfasst werden. Mehrere Autoren weisen auf eine gehäufte STEC-Prävalenz bei jungen Tieren, insbesondere abgesetzten Kälbern, hin (24, 52, 97). Schließlich ist die STEC-Prävalenz auch saisonalen Schwankungen unterworfen. Die meisten europäischen Studien beschreiben, wie auch Untersuchungen auf anderen Kontinenten, eine gehäufte Ausscheidung von STEC während der Sommermonate, rückläufige Prävalenzen dagegen im Winterhalbjahr (90, 91, 97, 276). Eine Ausnahme diesbezüglich macht die serbische Studie von Čobeljić *et al.*. Die Autoren konnten STEC vermehrt in den kälteren Monaten von Oktober bis März nachweisen (52).

Auch im außereuropäischen Raum weist die STEC-Prävalenz bei Rindern ähnliche Werte auf, wie es für Europa gezeigt werden konnte (Tab. 3). Hohen Herdenprävalenzen stehen sehr variable Einzeltierprävalenzen gegenüber (47, 49, 107, 128). Dies gilt, wenn auch auf niedrigerem Niveau, wenn ausschließlich STEC O157:H7 betrachtet werden (47, 91, 238). Auch in diesen Studien verweisen die Autoren zum Teil auf höhere STEC-Ausscheidungsraten bei abgesetzten Kälbern oder Färsen sowie während der Sommermonate (49, 91).

Beim Vergleich dieser Studien ist anzumerken, dass die zum Nachweis von STEC oder speziellen STEC-Serotypen herangezogenen Verfahren unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten aufweisen und, dass die angewandten epidemiologischen und statistischen Methoden stark variieren. Auch beinhalten die vorgestellten Studien Tiere unterschiedlicher Rassen, Haltung und Nutzungsart (47, 49, 70, 238). Die Ergebnisse der meisten dieser Studien können deshalb nicht direkt miteinander verglichen werden (167). Dennoch belegen sämtliche Untersuchungen, dass STEC unterschiedlicher Serotypen unabhängig von geographischer Lage, Klima, Rasse, Haltung und Altersstufe der Tiere in nahezu allen Rinderbeständen (3, 17, 24, 26, 50, 107, 128, 151, 166, 198, 202, 294, 295, 308, 323) häufig sogar über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden können.

Tab. 3: STEC-Prävalenzen bei Rindern außerhalb Europas

Quelle	Land	Anzahl untersuchter Proben/Bestände/Tiere	Anzahl pos. (%)	
			<i>E. coli</i> O157:H7	STEC allgemein
(47)	USA	2540 Proben insgesamt 28 Bestände	3 (7 %) Isolate	107 (4,5 %) 21 (75 %)
(238)	USA	2058 Proben insgesamt 10 Bestände	40 (1,9 %) 10 (100 %)	n.u. n.u.
(91)	USA	10832 Proben insgesamt 14 Bestände 1040 Kälber 3483 Absetzer/Färsen 4762 Adulte	113 (1,0 %) Bestände: 9 (64,3 %) Tiere: 0,7-2,3 % 13 (1,3 %) 58 (1,7 %) 20 (0,4 %)	n.u.
(70)	USA	560 Kälber (< 4 Mon) 70 Bestände	10 (1,8 %) 5 (7,1 %)	n.u.
(107)	BRA	153 Proben insgesamt 6 Bestände	2/202 (0,99 %) Isolate	39 (25,5 %) Bestände: 6 (100 %) Tiere: 8,8-84,6 %
(301)	J	324 Proben insgesamt 1 Bestand	11 (3,5 %) -	n.u.
(128)	J	385 Proben insgesamt 78 Bestände 87 Kälber 88 Färsen (5-12 Mon) 183 Kühe	1 (1,1 %) Isolat n.n. 1 Isolat	225 (58,4 %) k.A. 40 (46 %) 58 (66 %) 127 (69 %)
(49)	AUS	588 Proben insgesamt 3 Bestände Adulte (Milchkühe) Kühe (< 14 d vor Kalbung) Kühe (< 7 d nach Kalbung) Saugkälber (< 7 d) Kälber (7-14 d) Kälber (5-6 W) Kälber (12-14 W) Färse 1 Färse 2 Färse 3	1,9 % Bestände: 2 (66,6 %) Tiere: 0-3,4 % 1 (0,3 %) 1 (1,3 %) 6 (5,5 %) 11 (1,9 %) 	98 (16,7 %) Bestände: 3 (100 %) Tiere: 10,9-28,6 % 2 (1,7 %) 9 (10,7 %) 11 (12,2 %) 10 (12,7 %) 10 (27,8 %) 11 (29,7 %) 15 (41,7 %) 11 (30,6 %) 6 (17,1 %) 13 (37,1 %)

Erläuterungen: AUS: Australien; BRA: Brasilien; J: Japan; k.A.: keine Angaben; Mon: Monat; n.n.: nicht nachweisbar; n.u.: nicht untersucht; USA: Vereinigte Staaten von Amerika; W: Wochen.

3.2 Symptomatik boviner STEC-Infektionen

Abgesehen von wenigen Fallbeschreibungen, die ausschließlich Kälber in den ersten Lebenswochen betreffen, treten STEC als Krankheitserreger bei Rindern nicht in Erscheinung. Die in der Vergangenheit beschriebenen klinisch apparenten STEC-Infektionen bei Kälbern gingen zum Teil mit Dysenterie, Colitis, Ileitis oder Proktitis einher und wurden vor allem durch Vertreter der Serogruppen O5:H⁻, O26:H11, O26:H⁻ und O113:H21 verursacht (46, 87, 113, 247, 312). In einigen Fällen konnten typische A/E-Läsionen im Darm der erkrankten Tiere nachgewiesen werden.

Viele experimentelle STEC-Infektionen bei Rindern wurden mit STEC O157:H7-Isolaten durchgeführt. Obwohl das erste bovine STEC O157:H7-Isolat von einem Kalb mit Colibazillose isoliert wurde (199), konnten trotz hoher Inokulationsdosen (bis zu 10¹⁰ Kolonie bildende Einheiten (KbE)) mit diesem Stamm in den meisten Studien keine klinische Symptome oder histopathologische Veränderungen im Darm infizierter Tiere induziert werden (14, 85, 180, 195, 234, 311). Einige Autoren berichten allenfalls von milder, wässriger Diarrhoe oder Mukusbeimengungen im Kot bei Kälbern in den ersten Tagen nach der Inokulation des Teststammes (38, 56, 313). Aufgrund der Fallbeschreibungen von Diarrhoe-auslösenden STEC bei sehr jungen Kälbern (< 3 Wochen) (150, 173, 199, 247, 312), überprüften Dean-Nystrom *et al.* das pathogene Potential von STEC O157 in experimentell infizierten, neugeborenen Kälbern (60). Bei unter 12 Stunden alten, kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern verursachten die eingesetzten Teststämme Diarrhoe und histopathologische Veränderungen wie eine Ödematisierung der Kolonschleimhaut. Zusätzlich konnten in verschiedenen Abschnitten des Dün- und Dickdarmes Bakterien lokalisiert werden, welche sich typischerweise unter Ausbildung von A/E-Läsionen angeheftet hatten. In einer weiteren Arbeit wurden Dexamethason-behandelte Kälber im Alter von 3-5 Monaten experimentell mit STEC O157 infiziert (268). Obwohl die Tiere keine Veränderungen der Kotkonsistenz aufwiesen, waren regelmäßig A/E-Läsionen auf Epithel- und Kryptenzellen verschiedener Darmabschnitte sowie eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten zu beobachten. Interessanterweise reagierten 12 von 13 Versuchstieren mit einer Cholezystitis, welche durch ein Wandödem, eine Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und neutrophilen Granulozyten sowie durch teilweise Erosion des Epithels gekennzeichnet war. Auch in der Gallenblase konnten Bakterien des Inokulationsstammes sowie durch sie verursachte A/E-Läsionen nachgewiesen werden (268). Moxley *et al.* infizierten 24 Stunden alte, gnotobiotische Kälber mit einem STEC O5:K4:H⁻-Stamm,

welcher von einem 2 Tage alten, an Diarrhoe erkrankten Kalb isoliert worden war (173). Nach der Inokulation schieden die Tiere zum Teil blutigen, weichen Kot mit Schleimbeimengungen aus und zeigten einen leichten Anstieg der Körpertemperatur. Auch diese Autoren stellten histopathologische Veränderungen in Ileum und Dickdarm einschließlich A/E-Läsionen fest (173).

Da STEC klinische Erscheinungen bei Kälbern verursachen können, gab es mehrere Untersuchungen, die die STEC-Ausscheidung gesunder und an Durchfall erkrankter Tiere verglichen. Viele Autoren konnten dabei keine Unterschiede in der STEC-Ausscheidung zwischen kranken und klinisch gesunden Tieren feststellen (21, 22, 49, 83, 102). Höhere STEC-Prävalenzen bei an Diarrhoe erkrankten Kälbern beschreiben dagegen nur wenige Autoren (80, 138). Wieler *et al.* zeigten, dass bei 1-12 Wochen alten Kälbern für den gesamten Untersuchungszeitraum ein nur schwach signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Diarrhoe und dem Nachweis des Stx-Gens im Kot besteht. Allerdings konnte bei der Betrachtung einzelner Lebenswochen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Kälberdurchfall und der Ausscheidung bestimmter STEC-Virulenzfaktoren (1. Lebenswoche (LW): Hly_{HEC}; 1 & 10. LW: *eae*; 4. LW: *stx*) ermittelt werden (307).

3.3 Epidemiologie der STEC in der Rinderpopulation

3.3.1 Erstinfektion und STEC-Ausscheidung in verschiedenen Lebensabschnitten

Zahlreiche Studien belegen das Vorkommen von STEC bei neugeborenen Kälbern, so dass man von einer frühzeitigen Erstinfektion der Jungtiere ausgehen muss (24, 49, 52, 80, 235, 301, 308). Cobbold und Desmarchelier erhielten bei ihren Untersuchungen Hinweise darauf, dass Kälber bereits im Alter von 24-72 Stunden nach der Geburt STEC ausscheiden (49). Ähnliche Beobachtungen machten Garber *et al.* mit STEC O157:H7 bei Kälbern (80).

Kälber scheiden STEC häufiger aus als adulte Tiere. Innerhalb der Kälberpopulation fällt weiterhin auf, dass die Gruppe der abgesetzten Kälber meist deutlich höhere STEC-Prävalenzen aufweist als Saugkälber (49, 80, 309, 320) (Kapitel 3.1). In experimentellen Infektionen mit STEC O157 konnte gezeigt werden, dass Kälber nicht nur über einen längeren Zeitraum, sondern auch größere Mengen des Inokulationsstammes ausscheiden als adulte Tiere (56). In der Literatur werden verschiedene Ursachen für dieses Phänomen diskutiert. Zum einen werden die intensiven Haltungsbedingungen und der daraus folgende

höhere Infektionsdruck, zum anderen die erhöhte Prädisposition dieser Altersstufe verantwortlich gemacht. Letzteres könnte vor allem durch Umwelteinflüsse wie vermehrten Stress, Futterumstellung und daraus folgend veränderte pH-Werte im Magen-Darm-Trakt aber auch durch innere Faktoren wie ein noch unvollständig entwickeltes Immunsystem oder die stattfindende Entwicklung vom präuminanten zum ruminanten Darmtrakt bedingt sein (49, 80).

3.3.2 Intermittierende Ausscheidung von STEC und „Supershedder“

Ein Großteil der Studien zum Vorkommen und zur Verbreitung von STEC bei Rindern beschreibt nur eine Momentaufnahme des STEC-Infektionsstatus im untersuchten Tierbestand, da Proben häufig nur einmal oder in großen zeitlichen Abständen entnommen wurden. Hierbei werden aber die intermittierende Ausscheidung der Erreger bei infizierten Tieren und die variable Ausscheidung der Einzelindividuen eines Bestandes nur ungenügend abgebildet. Zahlreiche Studien belegen eine außerordentliche Variabilität der Einzeltierprävalenz in den untersuchten Betrieben und zwischen den untersuchten Tierkollektiven (6, 21-24, 97, 227, 298). In einer Langzeitstudie von Geue *et al.* zeigten zwei Tiergruppen deutliche Prävalenzunterschiede über die gesamte Dauer der Untersuchung, obwohl beide im selben Bestand unter identischen Bedingungen gehalten wurden (83). Aber es gibt auch ausgeprägte Unterschiede der STEC-Nachweisrate innerhalb einer einzigen Tiergruppe, wenn diese mehrmals zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt wird. Geue *et al.* bemerkten, dass die Anzahl der positiven Tiere innerhalb einer einzigen Tiergruppe an den einzelnen Untersuchungstagen beträchtlich schwankte. In Gruppe A waren am 23. und 24. Untersuchungstag bei keinem der Tiere STEC nachweisbar, jedoch schon am 25. Tag gelang ein positiver STEC-Nachweis bei über 90 % der Rinder (83). Die Autoren interpretieren diese Befunde mit der intermittierenden Ausscheidung der STEC und der daraus folgenden Zirkulation der Erreger innerhalb der Gruppe, so dass es mit hoher Frequenz zu Infektionen und Reinfektionen der Tiere kommt.

Dieses Modell mag die unterschiedliche STEC-Nachweisbarkeit innerhalb von Gruppen an verschiedenen Untersuchungstagen erklären. Sie liefert jedoch keine Antwort auf die Frage, warum es Herden mit durchschnittlich und wiederholt sehr hohen Prävalenzen gibt, andere Tierkollektive jedoch wiederholt negativ für STEC getestet werden bzw. STEC auf nur sehr niedrigem Niveau ausscheiden. Diese Situation wird in einer schottischen Veröffentlichung zum Vorkommen von STEC O157:H7 in 952 Betrieben beschrieben (275). Während in 78 %

der Betriebe diese Erreger nicht detektiert werden konnten, wies ein sehr geringer Anteil der Betriebe (~ 2 %) hohe STEC O157-Prävalenzen auf. Matthews *et al.*, welche die Daten dieser Studie erneut auswerteten, weisen darauf hin, dass die Gründe dieser Heterogenität unter anderem in Umweltfaktoren zu suchen sind. So können geographische Lage, Betriebsmanagement und das Vorkommen von Wildtieren die Übertragung von STEC O157:H7-Stämmen beeinflussen. Dennoch sehen sie es als wahrscheinlich an, dass es einzelne Tiere gibt, die besonders große Keimmengen an STEC O157:H7 mit den Faeces ausscheiden - so genannte „high“- oder „supershedder“ (154, 155). Die Autoren berufen sich zur Begründung ihrer Annahme auch auf weitere Veröffentlichungen, die das Auftreten einzelner Tiere beschreiben, welche große Mengen an STEC ausscheiden (71, 147, 180, 194, 197, 230). Naylor *et al.* stellten 2003 erstmalig die Hypothese auf, dass sich bei einer STEC O157:H7-positiven Tiergruppe eine kleine Anzahl solcher „supershedder“ findet (180). Nachfolgend wurden seine Beobachtungen von weiteren Autoren bestätigt, die ebenfalls eine geringe Anzahl von stark ausscheidenden Tieren bei Schlachtrindern beobachteten (71, 147, 194, 197). Robinson *et al.* bestätigten Naylor's Annahme erstmalig in einer Longitudinalstudie bei natürlich infizierten Kälbern (230). Matthews *et al.* werteten auch die Daten einer schottischen Prävalenzstudie in verschiedenen dynamischen epidemiologischen Modellen aus und kamen zu dem Ergebnis, dass die Prävalenzunterschiede erklärbar werden, wenn man annimmt, dass ein kleiner Teil der Tiere den Erreger in einer deutlich größeren Menge ausscheidet, als es andere Tiere tun. Durch Verhinderung der Infektion bei 5 % der Tiere mit der höchsten Ausscheidung könnte, den Angaben dieser Autoren zufolge, die STEC-Infektionsrate eines gesamten Bestandes so deutlich gesenkt werden, dass die Ausbreitung des Erregers vollständig zu kontrollieren wäre (154).

Die bisher bekannten Veröffentlichungen zum Phänomen der „high“- oder „supershedder“ beziehen sich fast ausschließlich auf die STEC-Serogruppe O157:H7. Nur Naylor *et al.* bezogen auch non-O157:H7-Stämme in ihre Untersuchungen ein. Dabei zeigt sich, dass hohe STEC O157:H7-Ausscheidungsraten von einer Kolonisierung des terminalen Rektums herrühren, welche demnach eine Voraussetzung für das Auftreten des „high-shedding“-Phänomens sein muss. Diese strenge Assoziation der Keime zur Schleimhaut des terminalen Rektums existiert nicht für non-O157:H7-Stämme (180).

Die meisten longitudinalen Untersuchungen zur STEC-Ausscheidung betrachten lediglich die An- oder Abwesenheit von STEC in den untersuchten Proben zu einem bestimmten Zeitpunkt, berücksichtigen jedoch nicht die tatsächlichen Keimzahlen im Untersuchungsgut. Dies ist

insofern problematisch, als hierbei wesentliche Schwankungen der Ausscheidung innerhalb kurzer Zeitabstände, verursacht beispielsweise durch diurnale Schwankungen der gastrointestinalen Bedingungen, nicht berücksichtigt werden und somit mögliche wichtige Informationen über Einflussfaktoren der STEC-Ausscheidung unbeachtet bleiben.

Daten zur Zahl der vom Tier ausgeschiedenen STEC liefern beispielsweise Studien mit experimentellen STEC-Infektionen von Rindern. Cray und Moon konnten in einer Untersuchung zeigen, dass Kälber mehr Keime (Koloniebildende Einheiten (KbE) je Gramm Kot) als Adulte ausscheiden (56). So fanden sich nach experimenteller STEC O157:H7-Infektion mit 10^{10} KbE in den ersten drei Tagen *post inoculationem* Keimzahlen von 10^7 KbE/g Kot bei adulten Tieren sowie über 10^9 KbE/g im Kot von Kälbern. Auch weitere Autoren konnten Keimzahlen von bis zu 10^5 KbE/g Kot bei experimentell mit STEC O157:H7 infizierten Kälbern feststellen (38, 195, 234).

Hinweise zur Zahl der ausgeschiedenen STEC liefern auch Untersuchungen bei natürlich infizierten Rindern. Umfangreiche Angaben liegen dabei insbesondere für STEC O157:H7 vor (136, 230, 255, 301, 320). Stämme dieses Serotypen konnten bei Schlachtrindern in Zahlen von bis zu 10^5 KbE/g Kot nachgewiesen werden (71, 147, 197). Vor allem Kälber zeigten in unterschiedlichen Studien hohe Ausscheidungsraten von bis zu 10^6 KbE/g Kot (230, 301, 320). Angaben zur Ausscheidungsmenge bei non-O157:H7 STEC finden sich dagegen nur selten. Widiasih *et al.* stellten bei natürlich infizierten Kälbern eine Ausscheidung bis zu 240 KbE/g Kot für STEC O26-Stämme fest. Die Keimzahlen lagen damit deutlich unter denen der im gleichen Zusammenhang untersuchten STEC O157-Stämme (301).

3.3.3 Dauer der STEC-Ausscheidung

Untersuchungen bei natürlich infizierten Tieren weisen darauf hin, dass Rinder STEC über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten ausscheiden können. Widiasih *et al.* untersuchten beispielsweise die Dauer der STEC O157-Ausscheidung bei natürlich infizierten Kälbern. Sie konnten zeigen, dass die Ausscheidungsdauer zwischen einer und zehn Wochen bei den individuell und wöchentlich beprobten Kälbern beträgt (301). Shaw *et al.* detektierten bei Kälbern STEC eines Serotyps an bis zu vier wöchentlich aufeinander folgenden Beprobungszeitpunkten (252).

Lange Ausscheidungsperioden konnten auch bei experimentell mit STEC O157:H7 inokulierten Rindern beobachtet werden (14, 38, 56, 195). So beschreiben Ohya und Ito bei

einem Kalb das über 31 Wochen andauernde Ausscheiden des Inokulationsstammes (195). Eine durchschnittliche Ausscheidungsdauer von 30 Tagen geben Sanderson *et al.* (234), von maximal 21 Tagen Brown *et al.* an (38). In der Untersuchung von Grauke *et al.* scheiden einzelne Tiere den Teststamm über zwei Monate aus (85).

Angeichts der weiten Verbreitung von STEC in der Rinderpopulation und der leichten Übertragbarkeit der Keime zwischen den Tieren sowie aus der Umgebung (14, 51, 117), stellt sich die Frage, ob die über einen langen Zeitraum nachweisbare Ausscheidung von STEC auch Folge einer Reinfektion mit dem Erreger sein könnte. Nach experimenteller STEC O157:H7-Infektion von Kälbern konnte der Inokulationsstamm bis zu 20 Wochen in den Fäzes einiger Tiere nachgewiesen werden (56). Den Kälbern dieses Versuches war der Nasenkontakt zu weiteren Kälbern der Gruppe möglich. Die Studie umfasste aber auch die experimentelle Inokulation adulter Tiere, welche so gehalten wurden, dass ein gegenseitiger Kontakt ausgeschlossen war. Dennoch gelang die Isolation des STEC-Stammes bis zur 14. Woche *post inoculationem*. Diese anhaltende STEC-Ausscheidung deutet auf die Ausbildung einer persistenten STEC-Infektion mit andauernder Ausscheidung hin.

Fraglich bleibt, inwieweit die lange Ausscheidungsdauer, wie sie im Rahmen von experimentellen Infektionsversuchen beobachtet wurde, nicht auch durch die dabei verabreichten sehr hohen Inokulationsdosen hervorgerufen sein könnte. Besser *et al.* zeigten hierzu, dass es möglich ist, bei in Gruppen gehaltenen Kälbern im Alter von 10 Wochen, bereits mit geringen Dosen von $< 300 - 10^4$ KbE eine mehrwöchige STEC-Ausscheidung herbeizuführen. Die verabreichten Inokulationsstämme wurden schon wenige Tage nach der Belastung vom inokulierten Kalb selbst aber auch von Kälbern der gleichen Gruppe, welche mit anderen STEC-Stämmen infiziert worden waren, in zum Teil beachtlichen Mengen (bis 1×10^6 KbE/gKot) ausgeschieden. Ebenfalls beobachtet wurde, dass eine STEC-Infektion von Kälbern mit nachfolgender Ausscheidung der Keime (bis 1×10^6 KbE/g Kot) selbst dann erfolgte, wenn nicht inokulierte Tiere gemeinsam mit solchen Kälbern aufgestellt wurden, die bereits 24 Tage zuvor mit niedrigen STEC Dosen inokuliert worden waren (14). Die Ausbildung einer persistenten STEC-Infektion mit anschließendem Langzeitausscheidertum scheint beim Kalb demnach selbst bei geringem Infektionsdruck sowie bei Vorhandensein von Reinfektionsmöglichkeiten, wie sie in der natürlichen Umgebung der Tiere gegeben sind, möglich.

3.3.4 Serotypen-spezifische STEC-Ausscheidung

Das Vorkommen von STEC verschiedenster Serotypen wurde bei zahlreichen Haus- und Wildtieren nachgewiesen (16, 170, 294, 300). Dabei zeigte sich, dass STEC-Serotypen nicht gleichmäßig über das STEC-Wirtsspektrum verteilt vorkommen, sondern dass es vielmehr zur Ausbildung Spezies-spezifischer Serotypen-Populationen kommt. So wurden beispielsweise unterschiedliche STEC-Serotypen bei kleineren Gruppen von Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen, selbst wenn diese in ein und demselben Betrieb gehalten wurden (16, 17, 131, 294).

Neben dem Vorkommen von STEC-Populationen bei den unterschiedlichen Wirtsspezies scheint auch eine Adaptation verschiedener STEC-Serotypen an Nischen innerhalb der Rinderpopulation selbst zu existieren. Beispielsweise kommt es zu einer regionalen Häufung bestimmter STEC-Serotypen bei Rindern, wie dem vermehrten Auftreten des O157:H7-Serotypen in Ländern wie Nordamerika, Großbritannien, Japan und Australien (49, 70, 276, 301). Nur gelegentlich werden Stämme dieses Serotypen in anderen Regionen isoliert (3, 26, 27, 83, 138, 294). Innerhalb einer Region können wiederum selbst bei nahe gelegenen Betrieben verschiedene Serotypenprofile in unterschiedlichen Beständen erhoben werden. Geue *et al.* untersuchten die STEC-Ausscheidung bei Tieren aus 4 Betrieben im nordöstlichen Deutschland. Die 2320 isolierten STEC-Stämme waren 41 verschiedenen Serotypen zuzuordnen. Diese kamen allerdings nicht gleichzeitig in allen Betrieben vor, sondern ihr Vorkommen war meist auf ein oder zwei Bestände beschränkt. Nur der Serotyp O20:H-NT konnte in allen vier Gruppen, zwei weitere (O26:H11 und O-NT:H-NT) in drei Tiergruppen nachgewiesen werden (83).

Schließlich scheinen sogar die unterschiedlichen Altersstufen innerhalb eines Bestandes eine Nische für bestimmte STEC-Serotypen darzustellen. Sehr umfangreiche Untersuchungen zur STEC-Ausscheidung mit besonderer Berücksichtigung verschiedener Serotypen machten Shaw *et al.* (252). In dem untersuchten Bestand konnten STEC-Stämme 14 unterschiedlicher Serotypen isoliert werden. Bei den Muttertieren und ihren zugehörigen Kälbern dominierten dabei jeweils verschiedene Typen. Auch gelang bei Kälbern unterschiedlicher Altersstufen die Isolation von STEC bestimmter Serotypen gehäuft. So konnten bei ein und demselben Kalb bis zu 5 verschiedene Serotypen innerhalb des Untersuchungszeitraumes isoliert werden. Da nur in einem Fall zwei verschiedene STEC-Serotypen aus einer Kotprobe isoliert werden konnten, stellten die Autoren die Hypothese auf, dass Rinder zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils einen dominanten STEC-Serotypen ausscheiden. Für ihre Annahme sprechen auch die

Ergebnisse von Pearce *et al.*, welche ebenfalls die unterschiedliche Dominanz verschiedener Serotypen in bestimmten Lebensabschnitten der Kälber feststellten (213).

Die Autoren einer australischen Studie konnten nachweisen, dass das Risiko eines Kalbs nach der Geburt STEC auszuschcheiden, doppelt so hoch ist, wenn es von einem STEC-ausscheidenden Muttertier geboren wurde (49). Dies deutete zunächst darauf hin, dass die vertikale Übertragung von STEC bei der Erstinfektion neugeborener Kälber eine bedeutende Rolle spielt. Interessanterweise konnte aber in mehreren Studien gezeigt werden, dass sich das Serotypen-Profil von STEC-Stämmen bei Muttertieren und ihren neugeborenen Kälbern voneinander unterscheidet. Zudem wiesen die Restriktionsmuster der Kälber-Isolate Übereinstimmungen mit denen von Isolaten anderer Tiere der Herde, nicht jedoch mit denen der Muttertiere auf. Die Autoren sehen in der nachgewiesenen Dominanz bestimmter STEC-Serotypen bei Muttertieren und Kälbern einen Beleg dafür, dass die horizontale Übertragung von STEC, ausgehend von der Umwelt oder anderen Tieren der Herde, eine entscheidendere Rolle bei der STEC-Infektion junger Kälber einnimmt, als die vertikale Übertragung durch das Muttertier (49, 50, 213, 252).

Als gesichert gilt mittlerweile auch, dass es sogar innerhalb des Magendarmtraktes der Rinder Bereiche gibt, an denen bestimmte Serotypen vermehrt kolonisieren und dadurch eine lang anhaltende Ausscheidung von STEC besonders begünstigen. So konnte die besondere Assoziation von STEC O157:H7, nicht jedoch anderer STEC-Serotypen, mit dem Epithel der rektoanal Schleimhautgrenze nachgewiesen werden (180, 253). Die experimentelle Inokulation von STEC O157:H7 an diesen Darmabschnitt zog eine wochenlange Ausscheidung des Teststammes nach sich und führte insgesamt zu einer effektiveren Kolonisierung der Schleimhaut als die orale Applikation des Stammes (253).

4 STEC-spezifische Immunität beim Rind

4.1 Humorale Immunität

Bis heute wurden insgesamt nur wenige Studien zur STEC-spezifischen humoralen Immunität bei Rindern durchgeführt. Während solche Untersuchungen beim Menschen die spezifische humorale Immunität gegenüber zahlreichen STEC-Virulenzfaktoren berücksichtigen, beschränken sich die Informationen bei natürlich infizierten Rindern im Wesentlichen auf den

Virulenzfaktor Stx und die O-Antigene, insbesondere O157. Lediglich im Rahmen experimenteller Infektionen und bei Immunisierungsversuchen wurde auch die humorale Immunität gegenüber weiteren STEC-Proteinen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind zusammenfassend in Tab. 4-Tab. 6 dargestellt.

Tab. 4: Studien zur bovinen STEC-spezifischen humoralen Immunität bei natürlichen STEC-Infektionen

Ref.	Tiere	Probe	Testantigen	Antikörper-Nachweis
(220)	Kühe	Serum (n = 40)	Stx1 Stx1+Stx2 Stx2	90 % 2,5 % 0 %
		Kolostrum (n = 225)	Stx1 Stx1+Stx2 Stx2	69,3 % 14,7 % 0 %
(31)	Kühe	Serum (n = 306)	Stx1 Stx2+Stx2c Stx2 Stx2e	78,4 % 1,3 % 5,6 % 12,1 %
(134)	Kälber 15 Herden	Serum (n = 878)	O157	83,7 % aller Seren Einzeltierprävalenz in Herden 63,3-100 %
(135)	Gruppen à 46/44/45 Kälber 1 Herde	Serum (n = 796)	O157	70 % 48 Stunden nach der Geburt seropositiv; 87,5 % seropositiv noch vor der 32 Lebenswoche; Durchschnittsalter bei Serokonversion in den Gruppen 16,8-41,4 Wochen; Serokonversion ~100 % bis zum 17. Lebensmonat
(57)	Kälber	Serum (n = 41)	O157	IgG: 100 % in 2 Lebenswoche bei 13 Tieren IgM-Antwort, erhöhte IgG-Titer
(302)	Kälber	Serum (n = 10)	O157, O26, O111	80 % Titeranstiege innerhalb 10 Stunden nach Kolostrumaufnahme, Maximaltiter bis mind. 80 Stunden; bei 20 % keine Antikörper nachweisbar
	Kühe (Muttertiere)	Kolostrum (n = 10)	O157, O26, O111	100 %, Abfall innerhalb 24 Stunden, Antikörper bis ca. 80 Stunden nach Abkalbung nachweisbar
		Serum (n = 6)	O157, O26, O111	100 % Titer Serum < Titer Kolostrum

Erläuterungen: Ref.: Referenz; **O157/O26/O111:** O157/O26/O111-Lipopolysaccharid von *E. coli*.

Tab. 5: Studien zur bovinen STEC-spezifischen humoralen Immunität bei experimentellen STEC-Infektionen

Ref.	Tiere/Infektion	Probe	Testantigen	Antikörper-Nachweis
(116)	4 Kälber; ID: 10^{10} KbE (STEC O157:H7 ^{Stx2+, Stx1+}), Reinokulation nach 22 (2 Tiere) oder 22 u. 33 Wochen (2 Tiere)	Serum	Stx1 Stx2 O157	bei 2/4 natürliche Stx1Ak, bei 0/4 Titeranstiege nach 1. Inokulation, 4/4 Titeranstieg nach 1. bzw. 2. Reinokulation 0/4, keine Titeranstiege nach Inokulation/ Reinokulation 4/4, Titeranstieg nach Reinokulation
	9 Stiere (3 Jahre) ID: 10^{10} KbE (STEC O157:H7 ^{Stx2+, Stx1+})	Serum	Stx1 Stx2 O157	bei 4/9 natürliche Stx1Ak, Titeranstiege nach Inokulation bei 7/9 0/9, keine Titeranstiege nach Inokulation 9/9, Titeranstieg nach Inokulation
	5 Stiere (1 Jahr) ID: 10^7 KbE (STEC O157:H7 ^{Stx2+, Stx1+})	Serum	Stx1 Stx2 O157	bei 5/5 natürliche Stx1Ak, keine Titeranstiege nach Inokulation 0/5, keine Titeranstiege nach Inokulation 5/5, Titeranstieg nach Inokulation
(101)	3 Gruppen à 5 Kälber, 2 Vorinokulationen mit STEC O157:H7 ^{Stx2+} o. STEC O157:H7 ^{Stx-} o. <i>E. coli</i> 123 ^{Stx-} (10^{10} KbE) Kälber aller Gruppen mit STEC O157:H7 ^{Stx2+} belastet (10^{10} KbE)	Serum	Stx2 O157	0/15, keine Titeranstiege nach Inokulation oder Belastung z.T. natürliche Antikörper gegen O157, nach Belastung Titeranstiege unabhängig vom Inokulationsstamm
(313)	6 Kälber mit STEC O157:H7 (2×10^8 KbE) inokuliert, 2 Kälber zusätzlich 14 Tage später reinokuliert (2×10^8 KbE)	Serum	O157	100 % vor/nach Inokulation IgG: bei 3/6 Titeranstieg nach Inokulation, bei 2/6 kein Anstieg IgM: Abfall nach Inokulation, Anstieg erst nach 5 Wochen, bei 1/6 kontinuierlicher Anstieg, bei 1/6 keine Antwort
	6 Muttertiere mit STEC O157:H7 (10^9 KbE) inokuliert, 2 Tiere einmal, 4 Tiere zweimal reinokuliert (10^9 KbE)	Serum	O157	100 % vor/nach Inokulation IgG: geringe Veränderungen nach Inokulation IgM: Anstieg bei 1/6

Fortsetzung der Tab. 5 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 5

Ref.	Tiere/Infektion	Probe	Testantigen	Antikörper-Nachweis
(178)	25 Kälber, bei 2 Kälbern 2 Vorinokulationen mit STEC O157:H7 ($4 \times 10^9/10^{10}$ KbE) nach vier Wochen alle mit STEC O157:H7 (2×10^{10} KbE) belastet	Serum	O157; H7	IgG/IgA: Anstieg nach Belastung (vorinokulierte > naive), Abfall der IgA- Titer schneller als IgG-Titer
(156)	8 Kälber oral inokuliert mit <i>E. coli</i> O157:H7 ^{Stx-} (10^{10} KbE)	Serum Nasensekret Rektalabstrich	H7	signifikanter Anstieg IgA und IgG signifikanter Anstieg IgA signifikanter Anstieg IgA
(36)	30 Rinder (nicht inokuliert)	Serum	Tir, Intimin, EspA, EspB, O157	natürliche Antikörper vorhanden (IgA < IgG)
	6 Järlingsrinder mit STEC O157:H7 ^{Stx2+} (10^9 KbE) inokuliert	Serum	Tir, Intimin, EspA, EspB, O157	IgG: Anstieg für Tir, Intimin, EspA, EspB IgA: Abfall für Tir, Intimin, EspA, EspB, Anstieg für O157 (nicht signifikant)
		Kot	Tir, Intimin, EspA, EspB, O157	keine IgG/IgA vor oder nach Inokulation nachweisbar

Erläuterungen: **EspA/EspB:** „*E. coli* secreted protein“ A/B; **H7:** H7-Flagellin von *E. coli* O157:H7 ZAP984^{Stx-}; **ID:** Inokulationsdosis; **KbE:** Kolonie bildende Einheiten; **mLT:** mutagenisiertes hitzelabiles Enterotoxin; **O157:** O157-Lipopolysaccharid von *E. coli* O157; **Ref.:** Referenz; **Stx1/Stx2Ak:** Stx1/Stx2-spezifische Antikörper; **Tir:** „translocated intimin receptor“.

Tab. 6: Studien zur bovinen STEC-spezifischen humoralen Immunität nach Immunisierung mit STEC-Antigen

Ref.	Tiere/Immunisierung	Proben	Testantigen	Antikörper-Nachweis
(132)	1 trächtige Kuh 14 x i.d. mit Stx1/Stx2-haltigem Kulturüberstand immunisiert	Kolostrum (n = 1)	Stx1+Stx2	Stx1Ak > Stx2Ak, Titer fallen von 1.-5. Tag nach der Abkalbung
	2 trächtige Kühe 14 x i.d. mit gereinigtem Stx2 immunisiert	Kolostrum (n = 2)	Stx2	2/2 nach Immunisierung Stx2Ak, Titerabfall 1.-2. Tag nach der Abkalbung
(290)	4 Kälber 2 x i.m. mit Int _{280-γ} immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (2,9 ± 0,78 x 10 ¹⁰ KbE)	Serum	Int _{280-γ}	z.T. natürliche Ak vorhanden, Anstieg IgG ₁
		Speichel	Int _{280-γ}	kein Anstieg spezifischer IgA-Antikörper
	4 Kälber 2 x i.m. mit Efa-I` immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (2,9 ± 0,78 x 10 ¹⁰ KbE)	Serum	Efa-I`	Anstieg IgG ₁
		Speichel	Efa-I`	kein Anstieg spezifischer IgA-Antikörper
	4 Kälber 2 x i.m. mit Int _{280-β} immunisiert, Belastung mit EHEC O26:H` (2,8 ± 0,67 x 10 ¹⁰ KbE)	Serum	Int _{280-β}	IgG ₁ -Anstieg
		Speichel	Int _{280-β}	IgA-Anstieg
	4 Kälber 2 x i.m. mit Efa-1-N/Efa-1-M immunisiert, Belastung mit EHEC O26:H` (2,8 ± 0,67 x 10 ¹⁰ KbE)	Serum	Efa-1-N, Efa-1-M	IgG ₁ -Anstieg
		Speichel	Efa-1-N, Efa-1-M	kein Anstieg spezifischer IgA-Antikörper
	4 Kälber 2 x i.m. und 2 x i.n. mit Int _{280-γ} /Efa-1` immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (2,9 ± 0,78 x 10 ¹⁰ KbE)	Serum	Int _{280-γ} /Efa-1`	IgG ₁ -Anstieg, Boostereffekt der ersten, nicht der zweiten i.n. Immunisierung
		Speichel	Int _{280-γ} /Efa-1`	IgA-Anstieg
	4 Kälber 2 x i.m. und 2 x i.n. mit EHEC O157 bacterin immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (2,9 ± 0,78 x 10 ¹⁰ KbE)	Serum	Int _{280-γ}	IgG ₁ -Anstieg
			Efa-1`	kein Anstieg spezifischer Antikörper
		Speichel	LPS O157	IgG ₁ -Anstieg
			Int _{280-γ}	IgA-Anstieg
(66)	4 Kälber (14 Tage) 3 x i.m. mit rEspA immunisiert, beim 3. Mal zusätzlich rEspA i.n., Belastung mit EHEC O157:H7 (1 x 10 ¹⁰ KbE)		Efa-1`	IgA-Anstieg
			LPS O157	kein Anstieg spezifischer IgA Antikörper
		Serum	rEspA	Anstieg IgG ₁
		Speichel	rEspA	Anstieg IgA

Fortsetzung der Tab. 6 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 6

Ref.	Tiere/Impfung	Proben	Testantigen	Antikörper-Nachweis
(222)	8 Kälber (6 Monate) 2 x s.c. mit Überstandspolypeptid (Esp, Tir) von EHEC O157:H7 immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (10 ⁸ KbE)	Serum	TypIII Sekretions Proteine	Anstieg spezifischer Antikörper, Steigerung nach 2. Immunisierung
	13 Jungrinder 3 x s.c. mit Überstandspolypeptid (Esp, Tir) von EHEC O157:H7 immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (10 ⁸ KbE)	Serum	TypIII Sekretions Proteine	Anstieg spezifischer Antikörper
	10 Jungrinder 3x s.c. mit Überstandspolypeptid (Esp, Tir) von ΔTir EHEC O157:H7 immunisiert, Belastung mit EHEC O157:H7 (10 ⁸ KbE)	Serum	TypIII Sekretions Proteine	Anstieg spezifischer Antikörper (außer Tir-spezifische)
(315)	2 Kälber 2x mit 64 K-Intimin (Adjuvanz mLT)	Speichel Nasensekret	64 K-intimin	Anstieg IgA nach Immunisierung
	2 Kühe 2x mit 64 K-Intimin (Adjuvanz mLT oder auf Ölbasis)	Serum Kolostrum	64 K-intimin	Anstieg IgG ₁ nach Immunisierung (wenn mLT als Adjuvanz)
(156)	8 Kälber (3 mal rektal immunisiert mit H7 Flagellin)	Serum Nasensekret Rektalabstrich Rektalbiopsie	H7	signifikanter Anstieg IgA, nicht signifikanter Anstieg IgG nicht signifikanter Anstieg IgA signifikanter Anstieg IgA nicht signifikanter Anstieg IgA

Erläuterungen: **Efa-1**: trunkierte Version von Efa-1 eines EHEC O157:H7-Stammes; **Efa-1-N/Efa-1-M**: rekombinante 1-993 (Efa-1-N) bzw. 994-1896 (Efa-1-M) Aminosäuren von Efa-1 (EHEC factor for adherence) des EHEC O:111:H7-Stammes E45035; **Esp**: „*E. coli* secreted protein“; **H7**: H7-Flagellin von *E. coli* O157:H7 ZAP984^{STX}; **i.d.**: intradermale Immunisierung; **i.m.**: intramuskuläre Immunisierung; **i.n.**: intranasale Immunisierung; **Int_{280-β}/Int_{280-γ}**: rekombinante carboxy-terminale 280 Aminosäuren von Intimin des EHEC O26:H7-Stammes 193 (Int_{280-β}) bzw. O157:H7-Stammes EDL933 (Int_{280-γ}); **KbE**: Kolonie bildende Einheiten; **mLT**: mutagenisiertes hitzlabiles Enterotoxin; **Ref.**: Referenz; **rEspA**: rekombinantes EspA (*E. coli* secreted protein A) des EHEC O157:H7-Stammes 85-170na1^K; **Tir**: „translocated intimin receptor“; **64 K-intimin**: rekombinantes trunkiertes C-terminales 64 kDa Protein des Intimin von EHEC O157:H7; ΔTir EHEC O157:H7: isogene Tir-Mutante eines Wildtyp STEC O157:H7-Stammes.

4.1.1 O-Antigene

Nahezu alle Studien zu O-spezifischen Antikörpern bei Rindern betrachten ausschließlich das Lipopolysaccharid O157. Eine einzige Untersuchung widmet sich in diesem Zusammenhang zusätzlich dem Vorkommen von O26- und O111-spezifischen Antikörpern (302). Viele Untersuchungen zeigen, dass Antikörper gegen STEC-spezifische O-Antigene in der Rinderpopulation weit verbreitet sind. Untersuchungen natürlich infizierter Rinder ergaben stets hohe Prävalenzen für O157-spezifische Serumantikörper (57, 134, 302) (Tab. 4). Auch Untersuchungen im Rahmen experimenteller Infektionen bestätigen die hohe Seroprävalenz, da zahlreiche Versuchstiere bereits vor der experimentellen Inokulation O157-spezifische Antikörper im Serum aufwiesen (36, 101, 116, 313).

Da bei serologischen Untersuchungen nicht nur das aktuelle Infektionsgeschehen selbst, sondern auch bereits stattgefunden Kontakte mit dem Antigen erfasst werden, liegen die Seroprävalenzen für O157-Antikörper meist weit über den Prävalenzen für die Ausscheidung von STEC O157 selbst. So konnten Laegreid *et al.* O157-spezifische Antikörper mit einer Einzeltierprävalenz von 63-100 % in allen 15 untersuchten Beständen nachweisen. Im Vergleich dazu betrug die Herdenprävalenz von im Kot nachweisbaren STEC O157 nur 87 % mit einem Anteil von 1,7-20 % ausscheidenden Tieren in den einzelnen Beständen (134). In einer weiteren Untersuchung der gleichen Autoren zur Prävalenz O157-spezifischer Antikörper konnte im Verlauf der ersten 70 Lebenswochen bei 136 Kälbern eines Bestandes bei nahezu 100 % der Tiere eine spezifische Serokonversion detektiert werden (135).

Widiasih *et al.* zeigten, dass O-spezifische Antikörper in großen Mengen im maternalen Kolostrum vorhanden sind, effizient auf neugeborene Kälber übertragen werden und ihr Gehalt im Serum der Kälber im Verlauf der ersten Lebenswochen wieder absinkt (302). Hinweise auf den Transfer dieser Antikörper auf neugeborene Kälber liefern auch die Untersuchungen von Laegreid *et al.*, der O157-spezifische Antikörper bereits 48 Stunden nach der Geburt bei 70 % aller untersuchten Kälber detektierte (135), sowie Cristancho *et al.*, die solche Antikörper bei allen untersuchten Milchkälbern eines kanadischen Bestandes detektieren konnten (57). Entsprechend der natürlichen Abnahme maternalen Antikörper im Serum neugeborener Kälber zeigten die O157-spezifischen Antikörpertiter im Laufe der 20-wöchigen Untersuchung eine abfallende Tendenz. Bei einigen Tieren kam es innerhalb des Untersuchungszeitraumes aber auch zu deutlichen O157-spezifischen IgG- bzw. IgM-Antworten (57). Letzteres verdeutlicht, dass junge Kälber unmittelbar nach dem Abfall

maternalen Antikörpertiter in der Lage sind, nach natürlichem Kontakt zu O157-positiven *E. coli* mit der Produktion endogener spezifischer Immunglobuline zu reagieren. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Studie von Laegreid *et al.* verwiesen, die zeigen konnten, dass ein Großteil (87,5 %) der untersuchten Kälber aus drei Gruppen eine O157-spezifische Serokonversion noch vor der 35. Lebenswoche, die Tiere einer Gruppe durchschnittlich im Alter von 16,8-41,4 Wochen zeigten.

Die Fähigkeit zur Bildung O157-spezifischer Antikörper bei Kälbern und adulten Rindern wurde von mehreren Autoren auch im Zusammenhang mit experimentellen STEC O157:H7-Infektionen beschrieben (36, 101, 116, 178, 313).

Die Menge der dabei gebildeten spezifischen Immunglobuline hängt von der verwendeten Inokulationsdosis ab und die produzierten Antikörper lassen sich meist über einen längeren Zeitraum nach dem Infektionsereignis noch nachweisen. Johnson *et al.* zeigten, dass es nach experimenteller Infektion mit einem STEC O157-Stamm zu einem deutlichen Titeranstieg O157-spezifischer Serumantikörper bei Kälbern und Stieren kam. Diese Antikörper waren über einen Zeitraum von bis zu 20 Wochen nachweisbar (116). Die Beobachtungen waren allerdings nur auf solche Tiere beschränkt, bei denen eine Inokulationsdosis des STEC-Stammes von 10^{10} KbE verwendet wurde. Bei Tieren welche mit einer Dosis von nur 10^7 KbE inokuliert wurden, konnten dagegen keine Veränderungen der O157-Titer festgestellt werden. Bei diesen Tieren ließen sich lediglich moderate O157-spezifische Titer mit marginalen Schwankungen nachweisen, welche nach Angaben der Autoren mit großer Wahrscheinlichkeit vorangegangenen oder nicht entdeckten gleichzeitigen Infektionen mit O157-positiven Bakterien zuzuordnen waren. Bretschneider *et al.* zeigten, dass natürliche O157-spezifische IgG-Antikörper im Serum von 30 adulten Tieren nachweisbar waren und dass nach experimenteller STEC O157:H7-Infektion von 6 Kälbern O157-spezifische IgA-Antikörper im Serum der Tiere bis zum 14. Tag nach Inokulation anstiegen. Fäkale O157-spezifische IgG und IgA-Antikörper konnten dagegen weder bei 30 natürlich infizierten adulten Tieren noch bei experimentell inokulierten Kälbern nachgewiesen werden (36). Wray *et al.* beobachteten einen Anstieg von O157-spezifischem IgG bei experimentell inokulierten Kälbern, wobei die Titer für O157-spezifische IgM-Antikörper gleichzeitig abnahmen. Bei den ebenfalls inokulierten Adulten konnten dagegen keine nennenswerten Titerveränderungen O157-spezifischer IgG oder IgM-Antikörper im Zusammenhang mit der Inokulation festgestellt werden (313).

Kälber können O157-spezifische Immunglobuline nicht nur nach einem Antigenstimulus produzieren, sondern sind nach einer erneuten Belastung auch zur gesteigerten und raschen

Produktion solcher Antikörper fähig. Hoffmann *et al.* beobachteten diesbezüglich einen O157-spezifischen Titeranstieg bei allen STEC O157:H7 belasteten Kälbern. Diese Antwort verlief jedoch bei denjenigen Tieren höher, die einige Wochen vorher bereits mit einem STEC O157-Stamm vorinokuliert worden waren (101). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Naylor *et al.*: Kälber, die zweimal mit einem homologen STEC O157:H7-Stamm inokuliert wurden, entwickelten nach der Belastungsinokulation deutlich höhere O157- und H7-IgG und -IgA-Titer als Kälber, welche vorher keinen Kontakt zu dem entsprechenden STEC-Stamm hatten. Der Autor weist auch darauf hin, dass die nach den Belastungen gebildeten O157- und H7-spezifischen IgA-Antikörper deutlich schneller in ihrer Titerhöhe abnahmen als die entsprechenden IgG-Antikörper (178).

4.1.2 Stx

Borman-Eby *et al.* überprüften die neutralisierenden Eigenschaften von Rinderseren gegenüber verschiedenen Stx-Varianten. Eine Quantifizierung von Antikörpern wurde dabei nicht vorgenommen. Bei der Untersuchung von 306 Rindern aus 164 Beständen wiesen insgesamt 78,4 % aller Seren neutralisierende Eigenschaften gegenüber Stx1 auf. Stx2 bzw. dessen Varianten wurden dagegen von nur 14,1 % der Seren neutralisiert. 90 % der Seren, welche neutralisierende Eigenschaften gegen Stx2 bzw. dessen Varianten zeigten, taten dies auch für Stx1 (31).

Ähnliche Beobachtungen machten Pirro *et al.* bei natürlich infizierten Rindern in Deutschland (220). In Kolostrumproben von Kühen wurden neutralisierende Antikörper in 84 % der untersuchten Proben detektiert. Von diesen Kolostren wiesen 100 % eine neutralisierende Aktivität gegenüber Stx1, dagegen nur 14,7 % gegen Stx1 und Stx2 auf. Keine der Proben neutralisierte ausschließlich Stx2. Vergleichbare Ergebnisse erhielt der Autor bei der Untersuchung von 40 Serumproben von Färsen. Hier lag der Anteil der Stx1-neutralisierenden Proben mit über 90 % ebenfalls sehr hoch. Stx1 und Stx2 konnte dagegen nur von 2,5 % der Seren neutralisiert werden (220).

Die Stx-spezifische humorale Immunität bei Rindern wurde auch im Zusammenhang mit experimentellen STEC O157:H7-Infektionen bestimmt. Johnson *et al.* konnten trotz hoher Inokulationsdosis mit einem Stx1- und Stx2-produzierenden STEC-Stamm bei keinem der Tiere Stx2-spezifische Antikörper feststellen. Stx1-spezifische neutralisierende Antikörper (Stx1Ak) dagegen fanden sich bereits vor der experimentellen Inokulation im Serum

zahlreicher Tiere. Ihr Titer änderte sich in den betrachteten Tierkollektiven nach der Infektion mit dem STEC-Stamm sehr unterschiedlich. In der Gruppe der Kälber (8-12 Wochen) konnte nach erstmaliger Infektion mit 10^{10} KbE keine nennenswerte Veränderung der Titer festgestellt werden. Die zweite Inokulation, welche bei den Tieren im Alter von 30-34 bzw. 41-45 Wochen durchgeführt wurde, rief dagegen einen leichten bis moderaten Titeranstieg von Stx1Ak hervor. Auch bei den adulten Tieren konnte ein Anstieg der Stx1Ak-Titer beobachtet werden, wobei zu erwähnen bleibt, dass bei zwei Tieren auch nach dieser hohen Inokulationsdosis zu keinem Zeitpunkt Stx1Ak nachweisbar waren. Wie auch für die O157-spezifischen Antikörper beobachtet, kam es in der Gruppe der einjährigen Tiere, welche einer Inokulationsdosis von nur 10^7 KbE ausgesetzt waren, nicht zu Veränderungen der Stx1Ak-Titer. Die in der Studie nicht inokulierten aber natürlich infizierten Kontrollkälber wiesen im Alter von 7 Wochen unterschiedlich hohe Gehalte an Stx1Ak im Serum auf. Bis zum zweiten Entnahmezeitpunkt im Alter von 12 Wochen fielen bei allen untersuchten Kälbern die Titer ab oder veränderten sich nicht mehr. Während bei der letzten Entnahme im Alter von 18 Wochen bei einigen Kälbern die Titer weiter gefallen waren, zeigte sich bei anderen ein leichter oder deutlicher Titeranstieg. Bei einem Kalb konnten zu keinem Zeitpunkt Stx1Ak festgestellt werden (116).

Mit Hilfe einer Stx-basierten Immunisierung von Rindern gelang Kuribayashi *et al.* die Induktion Stx1- und auch Stx2-spezifischer Serumantikörper (132). Für die Gewinnung von kolostralen Stx-spezifischen Antikörpern wurde eine trächtige Kuh 3-4 Monate vor der Abkalbung mit Stx1/Stx2-haltigem Kulturüberstand insgesamt 14-mal im Abstand von 7 Tagen intradermal immunisiert. Das Tier zeigte nach der Abkalbung hohe Titer kolostraler Stx1- und Stx2-spezifischer neutralisierender Antikörper, welche bis zum Tag 5 nach der Abkalbung kontinuierlich abnahmen.

Zwei weitere Tiere wurden auf gleiche Weise, jedoch mit aufgereinigtem Stx2 immunisiert. Kolostrale Stx2-spezifische neutralisierende Antikörper (Stx2Ak) konnten bei einem Tier bis zum zweiten, bei der zweiten Kuh bis zum fünften Tag nach der Abkalbung nachgewiesen werden. Der Titer für Stx2Ak im Kolostrum lag bei diesen Kühen jedoch deutlich unter dem Titer des Tieres, welches mit dem Stx1/Stx2-haltigem Kulturüberstand immunisiert wurde (132).

Die Autoren der genannten Untersuchungen deuten die niedrige Seroprävalenz für Stx2-spezifische Antikörper, im Vergleich zur häufigen Nachweisbarkeit von Antikörpern gegen

Stx1, unterschiedlich. Pirro *et al.* sehen den Grund im geringeren Kontakt von Rindern mit Stx2-bildenden STEC-Stämmen. Diese Annahme kann aufgrund der Prävalenzdaten zum Vorkommen von STEC und aufgrund der umfassenden Charakterisierung von STEC-Isolaten jedoch aus heutiger Sicht verworfen werden. Die Autoren ziehen aber auch eine geringere Immunogenität von Stx2 verglichen mit Stx1 bei Rindern in Betracht (31, 116, 220), da Stx2-produzierende Stämme bei natürlich infizierten Rindern häufig nachgewiesen wurden und da der zur experimentellen Infektion herangezogene STEC-Stamm in Johnsons Untersuchungen die Gene für Stx1 und Stx2 gleichermaßen besitzt. Zusätzlich verweisen sie auf die ebenfalls geringere Induzierbarkeit von Stx2-spezifischen Antikörpern nach STEC-Infektionen bei Menschen und Schweinen (116). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass beim Menschen eine hohe Prävalenz Stx2-spezifischer Antikörper vorliegt. Ihr Nachweis konnte jedoch lange Zeit nicht geführt werden, da ein Bestandteil des humanes Serums (human serum amyloid P component, HuSAP) die Eigenschaft besitzt, Stx2 unabhängig vom Vorhandensein Stx2-spezifischer Antikörper, unspezifisch zu neutralisieren (44, 124).

4.1.3 Weitere STEC-Antigene

Im Zuge der intensiven Bemühungen zahlreicher Forschergruppen um die Entwicklung einer möglichen Vakzine zur Reduktion der STEC-Ausscheidung bei Rindern, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Vakzinierungsversuche mit verschiedensten STEC-Impfantigenen bei Rindern durchgeführt (Tab. 6) Um die Protektivität einer solchen aktiven Immunisierung abschätzen zu können, standen neben der STEC-Ausscheidung nach experimentellen Infektionen auch der Nachweis von Serumantikörpern gegen die entsprechenden Impfantigene im Fokus der Untersuchungen.

Es konnte regelmäßig eine vermehrte Bildung spezifischer IgG-Moleküle im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden, wenn Kälber mit zellbindenden Domänen der Intimin-Subtypen β oder γ (Int_{280- β} , Int_{280- γ}) oder mit einem trunkiertem Efa-1 Protein („EHEC factor for adherence“) intramuskulär immunisiert wurden (290). Auch bei intramuskulär mit EspA („*E. coli* secreted protein A“) vakzinierten Kälbern zeigte sich ein deutlicher Anstieg von spezifischem Serum-IgG und Speichel-IgA (66). Ähnliche Beobachtungen wurden auch nach der subkutanen Verabreichung von bakteriellem Überstandsprotein gemacht, welches die Typ III-Sekretionsapparat-Proteine Tir („translocated intimin receptor“) sowie verschiedene Esp-Proteine enthielt (222). Immunisierungsversuche von Kälbern und Kühen mit einem

rekombinant hergestellten Intimin (64 K-Intimin) riefen hingegen eine spezifische IgA-Antwort im Speichel und Nasensekret von intranasal immunisierten Kälbern sowie eine starke spezifische IgG₁-Antwort im Serum und Kolostrum von intranasal oder intramuskulär immunisierten Kühen nur dann hervor, wenn das rekombinante Protein in Kombination mit einem mutagenisierten hitzelabilen Enterotoxin (mLT) als Adjuvanz verabreicht wurde (315).

Die Induktion der STEC-spezifischen humoralen Immunität konnte neben der intramuskulären oder subkutanen Verabreichung von STEC-Proteinen auch durch die orale Inokulation von STEC-Stämmen selbst hervorgerufen werden. Eine mögliche Induktion spezifischer Antikörper gegen Typ III-Sekretions-Proteine (Tir, EspB, EspA) sowie Intimin nach oraler Inokulation eines STEC O157:H7 bei Jährlingsrindern wurde von Bretschneider *et al.* untersucht (36). Dabei konnten nach der Inokulation signifikant höhere Titer, verglichen mit dem Titer bereits natürlich vorhandener Antikörper, von spezifischen Serumantikörpern (IgG) gegen Intimin, Tir, EspA und EspB gemessen werden, welche mit Ausnahme EspB-spezifischer Antikörper ab dem 42. Tag nach der Inokulation wieder abfielen. Interessanterweise beobachteten die Autoren, dass spezifische IgA-Serumantikörper unmittelbar nach dem Tag der Inokulation abfielen. Eine mögliche Erklärung sehen die Autoren in dem vermehrten Verbrauch solcher Antikörper nach der Inokulation durch eine Bindung an den Belastungs-Stamm sowie dessen Sekretionsprodukte. Das Vorkommen fäkaler IgG- und IgA-Antikörper gegen die genannten Proteine wurde in dieser Studie ebenfalls untersucht, solche Antikörper konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (36).

Die in den Vakzinierungsversuchen induzierten Serumantikörper gegen verschiedene STEC-Proteine lassen vermuten, dass natürlich infizierte Rinder auch während der normalen Exposition mit STEC-Stämmen Serumantikörper gegen zahlreiche STEC-Antigene bilden und dass solche Immunglobuline via Kolostrum an neugeborene Kälber weitergegeben werden. In einer Studie wird das natürliche Vorkommen von Serumantikörpern gegen Intimin, Tir, EspA und EspB bei 30 Tieren einer Kontrollgruppe beschrieben. Demnach wiesen alle untersuchten Tiere IgG- und IgA-Antikörper gegen die genannten Proteine auf, wobei die Gehalte an IgA-Antikörpern deutlich niedriger als die IgG-Gehalte waren (36). Auch van Diemen *et al.* beobachteten, dass bei einigen Kälbern bereits vor der Immunisierung Antikörper gegen Int_{280-γ} und Efa-1⁺ nachweisbar waren. Da die Antikörper nach dem 28. Lebenstag der Kälber nicht mehr detektiert werden konnten, argumentieren die Autoren, dass es sich hierbei vermutlich um Antikörper kolostralen Ursprungs gehandelt hat (290).

Systematische Untersuchungen zur Prävalenz solcher Antikörper bei natürlich infizierten Rindern fehlen jedoch, da bislang nur eine kleine Auswahl an STEC-Virulenzfaktoren, welche als besonders aussichtsreiche Kandidaten für eine mögliche Immunisierung von Rindern gelten, auf ihre antigenen Eigenschaften bei natürlich und experimentell infizierten Tieren untersucht wurden.

4.1.4 Protektivität einer humoralen STEC-Immunität

Bei experimentell infizierten Rindern können die meisten Autoren keinen Einfluss des humoralen Immunstatus auf die STEC-Ausscheidung eines Tieres feststellen. So konnte wiederholt gezeigt werden, dass Rinder O157- und/oder Stx-spezifische Antikörper nach einer Inokulation mit STEC bilden. Eine Protektivität gegenüber einer Reinfektion oder eine Reduktion der Keimzahl ausgeschiedener STEC wurde dabei jedoch nicht beobachtet (36, 101, 116, 178, 312).

Dieses Phänomen wird auch von Autoren beschrieben, die STEC-Proteine parenteral applizierten (Tab. 6). In solchen Immunisierungsversuchen konnte trotz deutlicher Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort die intestinale Kolonisierung mit STEC nach der Belastung ebenfalls nicht verhindert werden. Auch die Zahl ausgeschiedener Bakterien sowie die Dauer der Ausscheidung des Belastungsstammes ließen sich nicht von derjenigen der Kontrolltiere unterscheiden (66, 290).

Andere Autoren hingegen messen der humoralen Immunität bei der Reduktion der STEC-Ausscheidung durchaus eine gewisse Bedeutung zu. Jungrinder, die vor der Belastungsinfektion bereits zweimal mit dem entsprechenden STEC-Stamm inokuliert worden waren, schieden in einem Zeitraum von 15 Tagen nach der Belastung deutlich weniger Bakterien des Inokulationsstammes aus als Tiere, die vor der Belastung nicht inokuliert worden waren. Bei den mehrfach inokulierten Tieren wurden zudem nach der Belastung höhere Titer spezifischer O157- und H7-Antikörper festgestellt als bei Kontrolltieren (178).

Nach Vakzinierung von 6 Monate alten Kälbern und adulten Rindern mit Proteinen aus dem Überstand einer STEC O157:H7-Kultur (enthielt Typ III Sekretionsproteine) entwickelten immunisierte Tiere eine ausgeprägte humorale Immunität gegen die Typ III Sekretionsproteine Esp und Tir. Nach der Belastung mit einem STEC O157:H7-Stamm konnte daraufhin eine Reduktion der Zahl ausscheidender Tiere, der Dauer der Ausscheidung sowie

der ausgeschiedenen Keimzahlen im Vergleich zu den Placebo-immunisierten Gruppen verzeichnet werden. Der Einfluss dieser Vakzine auf die STEC-Ausscheidung wurde auch in einer Feldstudie unter natürlichen Infektionsbedingungen bei 291 Stieren getestet. Nach dreimaliger subkutaner Injektion konnte bei der Betrachtung des gesamten Untersuchungszeitraumes in der Gruppe der vakzinierten Rinder eine STEC O157:H7-Ausscheidung bei deutlich weniger Tieren (8 %) beobachtet werden, als dies in der Placebo-Gruppe (21,3 %) der Fall war (222). Van Donkersgoed *et al.* überprüften die Wirksamkeit dieser Vakzine in 9 Anlagen zur Endmast von Rindern (sog. „feed lots“) à 10000-35000 Tiere unter natürlichen Infektionsbedingungen in Kanada. Nach zweimaliger Applikation des Impfstoffes stellten die Autoren allerdings zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss der Vakzinierung auf die STEC O157:H7-Ausscheidung der Tiere fest (292).

Auf die besondere Bedeutung der humoralen Immunität in Form von spezifischen IgA-Antikörpern bezüglich einer Protektivität gegenüber der STEC-Kolonisierung wird von mehreren Autoren verwiesen. Der rasche Abfall von induzierten spezifischen IgA-, nicht jedoch IgG-Antikörpern, könnte für die unzureichende Protektivität gegenüber einer STEC-Neubesiedlung verantwortlich sein, wenn diese längere Zeit nach der initialen Infektion erfolgt (178). Gleichzeitig könnte die rasche Abnahme spezifischer IgA-Antikörper im Serum nach experimentellen Infektionen auch Ausdruck eines vermehrten Verbrauches solcher Moleküle am Ort der Infektion, beispielsweise durch Binden an die Erreger bzw. deren Sekretionsprodukte sein. So verzeichneten Bretschneider *et al.* einen signifikanten Abfall von spezifischen Serum-IgA-Antikörpern nach experimenteller Infektion mit einem O157:H7-Stamm. Interessanterweise betraf dies ausschließlich Antikörper, die gegen bakterielle Proteine gerichtet waren, welche eine bedeutende (Intimin, Tir) oder unterstützende (EspB) Rolle bei der STEC-Kolonisierung des Rindes besitzen. O157-spezifische Antikörper waren von diesem raschen Abfall dagegen nicht betroffen (36).

4.2 Zelluläre Immunität und ihre mögliche Bedeutung

Hoffmann *et al.* untersuchten im Rahmen einer experimentellen Infektion den zeitlichen Verlauf der zellulären, STEC-spezifischen Immunität bei 6-8 Wochen alten Kälbern in Relation zur Ausscheidungsdynamik der verwendeten *E. coli*-Stämme. Dazu wurden die Tiere einer Gruppe mit einem Stx2-bildenden STEC O157:H7 (STEC O157:H7^{Stx2+}), die Tiere einer weiteren Gruppe mit einem Stx-negativen *E. coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7^{Stx-})

zweimal im Abstand von 3 Wochen inokuliert. Nach weiteren drei Wochen wurden die Kälber beider Gruppen mit dem STEC O157:H7^{Stx2+} belastet. Die Ausbildung einer spezifischen zellulären Immunität gegen STEC O157:H7-Vollantigen konnte erstaunlicherweise nur bei den *E. coli* O157:H7^{Stx-}-inokulierten Tieren beobachtet werden. Die Aktivität dieser zellulären Immunität war dabei im Verlaufe der wiederholten Inokulationen kontinuierlich gestiegen und selbst nach Belastung mit dem STEC O157:H7^{Stx2+} noch weiter steigerbar. Bei den ausschliesslich mit STEC O157:H7^{Stx2+} inokulierten Kälbern blieb die Entwicklung einer STEC-spezifischen zellulären Immunität hingegen vollständig aus (101).

In der Studie wurden keine Unterschiede in Dauer oder Menge ausgeschiedener Keime bei STEC O157:H7^{Stx2+}- und *E. coli* O157:H7^{Stx-}-vorinokulierten Kälbern beobachtet. Dabei konnte ein Einfluss weder der O157-spezifischen humoralen Immunität, noch der STEC-spezifischen zellulären Immunität auf die Ausscheidung des Belastungsstammes festgestellt werden (101). Allerdings wurde die Ausscheidung lediglich über einen Zeitraum von 20 Tagen nach der Belastung erfasst. Welchen Einfluss die zelluläre STEC-spezifische Immunität jedoch bei der Etablierung eines monatelangen Ausscheidertums hat, bleibt weiterhin ungeklärt.

5 Antigen-unspezifische Immunmodulation durch STEC-Faktoren

Die unzureichende Fähigkeit von Rindern, STEC nach der Infektion wieder zügig aus dem Magen-Darm-Trakt zu eliminieren, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Neben einer schlechten Immunogenität potentiell protektiver Antigene könnte das Vermögen der Erreger, die Immunantwort des Wirtes aktiv zu modulieren, eine Rolle spielen. Bislang wurden bei STEC zwei immunmodulatorisch wirksame Virulenzfaktoren identifiziert.

5.1 Lymphostatin

Ein STEC-Faktor, der möglicherweise einen Einfluss auf bovine Immunzellen ausübt, ist ein von *efa-1* (EHEC factor for adherence) kodiertes Protein. Das Gen wurde 2000 von Nicholls *et al.* erstmals beschrieben und weist eine 99 %-ige Nukleotidsequenzhomologie zu *lifA* der enteropathogenen *E. coli* (EPEC) auf (184). Das Genprodukt von *lifA* (Lymphostatin) inhibiert die Proliferation humaner peripherer Blutlymphozyten (PBMC) sowie die mitogenabhängige Synthese von Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5 und γ -Interferon (126). Weiterhin hemmt Lymphostatin die Proliferation humaner und muriner gastrointestinaler Lymphozyten

und hat damit möglicherweise einen modulierenden Einfluss auf die mukosale Immunität im Darm des Wirtes (111, 125, 153).

Ein vollständiges *lifA/efa-1* kommt chromosomal kodiert in EPEC, non-O157 STEC (184) aber auch in weiteren Enterobacteriaceae-Spezies wie *Citrobacter rodentium* oder *Hafnia alvei* sowie in REPEC (rabbit EPEC) vor (112, 126, 184). *E. coli* O157-Stämme besitzen eine verkürzte Version des Gens (*efa-1'*) in ihrem Chromosom (93, 215). Zusätzlich wurde bei solchen Stämmen ein Gen (*ToxB/I7095*) mit deutlicher Ähnlichkeit zu *efa-1* auf dem Virulenzplasmid pO157 identifiziert (42, 126, 152, 184).

Neben ihrer möglichen Bedeutung als Kolonisationsfaktoren (184, 280, 281) steht vor allem das immunmodulatorische Potential der erwähnten Proteine im Fokus der Untersuchungen. So wurde gezeigt, dass *E. coli* ohne pO157-Plasmid keine inhibierenden Effekte auf die IL2- und IL4-Synthese humaner PBMC ausüben. Aus diesem Grund wird diskutiert, ob ToxB ein funktionelles Lymphostatin-Homolog ist (126).

Schließlich wurde von einigen Autoren geprüft, ob Efa-1, Efa-1' und ToxB die Kolonisierung von STEC im Rind beeinflussen und ob ein modulierender Einfluss auch auf bovine Immunzellen nachzuweisen ist. Lysate von *lifA*-positiven EPEC riefen, im Gegensatz zu *lifA*-Mutanten, eine deutliche Hemmung der mitogen-stimulierten Proliferation boviner PBMCs hervor (1, 263). Auch für Stx-negative, Efa-1-haltige STEC O103:H2-Lysate sowie ToxB/Efa-1'-haltige STEC O157:H7-Lysate konnte dieser inhibierende Effekt nachgewiesen werden (1). Allerdings trat diese Wirkung in geringem Umfang auch ein, wenn Lysate *efa-1*-, *efa-1'*- und *toxB*-defizienter Mutanten verwendet wurden. Dies spricht dafür, dass die beobachtete Wirkung nicht ausschließlich diesen Genprodukten zuzuschreiben ist. Die stärkste Reduktion der Lymphozytenproliferation verglichen mit der Wirkung ihrer defizienten Mutante konnte dabei noch mit dem *efa-1*-positiven O103:H2-Lysat erzielt werden. Dennoch waren die messbaren Effekte deutlich schwächer als die durch *lifA*-haltige Bakterienlysate hervorgerufene Proliferationsinhibierung (1).

Obwohl Efa-1 bzw. dessen verwandte Genprodukte Efa-1' und ToxB einen modulierenden Einfluss auf bovine Immunzellen haben könnten und *in vitro*-Befunde auf einen Effekt von *efa-1*, *efa-1'* und *toxB* bei der Kolonisierung epithelialer Zellen hindeuteten (1, 264, 266), konnte eine reduzierte Ausscheidungsdauer nach experimenteller Infektion von Kälbern und Schafen nur für *efa-1*-, nicht jedoch für *efa-1'*- oder *toxB*-defiziente Stämme beobachtet werden (263, 264).

5.2 Stx

Stx wirkt beim Rind am Ort der STEC-Infektion lokal auf die Zellen der adaptativen mukosalen Immunität (162). *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass die identifizierten Zielzellen zum Teil hoch empfindlich auf Stx reagieren (162, 163, 165, 172). Die hervorgerufenen Effekte sind dabei nicht zytolethal sondern ausschließlich modulierender Natur. So bindet Stx1 *in vitro* an Gb₃/CD77-positive periphere Lymphozyten (161, 165, 260) und inhibiert auf diese Weise die Proliferation bestimmter Lymphozytenpopulationen (CD8 α ⁺ T-Zellen, B-Zellen) (165). Das Toxin hemmt dabei nur in einer sehr frühen Aktivierungsphase die Proliferation und die Interferon- γ (IFN- γ)-Synthese der Lymphozyten. In dieser Phase bilden die Zellen noch wenige, aber hochaffine Stx-Rezeptoren aus. Zu einem späteren Zeitpunkt der Lymphozytenaktivierung dagegen sind die Zellen gegenüber der Wirkung von Stx wieder anerg. Auch intraepitheliale Lymphozyten (IEL) des Rindes exprimieren den Stx-Rezeptor. *In vitro* werden sie durch Stx1 in ihrer Proliferation gehemmt und reagieren bei Anwesenheit des Toxins mit einer gesteigerten Transkription des Gens für das Zytokin IL-4 (163, 172). CD8 α ⁺ IEL exprimieren zu einem Großteil den Stx-Rezeptor auch *in situ* (163). Nach Inokulation von Darmschlingen bei Kälbern mit Stx1-bildenden STEC war die Anzahl solcher intestinalen Zellen innerhalb von 12 Stunden deutlich reduziert (164). Eine Hemmung zellulärer Immunmechanismen durch Stx konnte auch in Infektionsversuchen mit Kälbern nachgewiesen werden (101).

Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen belegen, dass Stx nicht eine bereits bestehende Immunität supprimiert, sondern vielmehr in der Lage ist, eine sich gerade entwickelnde Immunantwort zu unterdrücken (101, 162). Stx könnte deshalb als putativer Kolonisationsfaktor angesehen werden, der vor allem bei der Erstinfektion immunologisch naiver Tiere seine grösste Wirkung entfaltet und der Entstehung persistenter boviner STEC-Infektionen im Kälberalter Vorschub leistet.

STEC kommen bei Rindern weltweit vor. Die Tiere haben bereits früh nach der Geburt Kontakt zu STEC und können dann aufgrund der weiten Verbreitung der Erreger zu jedem Zeitpunkt mit STEC (re)infiziert werden. Dabei werden Rinder abhängig vom Alter von verschiedenen STEC-Isolaten bevorzugt besiedelt. Eine Immunisierungsstrategie sollte einerseits frühzeitig im Kälberalter erfolgen, um die Stx-Wirkung auf die sich entwickelnde STEC-Immunität zu unterbinden. Andererseits müsste sich die Strategie gegen alle bovinen STEC-Stämme richten. Stx ist, im Gegensatz zu zahlreichen anderen Virulenzfaktoren, allen

STEC-Stämmen gemeinsam. Eine Bekämpfungsstrategie auf Basis dieses Faktors wäre besonders effektiv, da sämtliche bovine STEC-Stämme einbezogen werden könnten und somit auch die potenziell für den Menschen gefährlichen STEC-Isolate erfasst würden.

V Material und Methoden

1 Probengewinnung

1.1 Betriebsdaten

Alle Proben entstammten Tieren der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof (Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Prof. Dr. G. Erhardt) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Beprobte wurden Tiere der Milchkuhherde sowie ihre neugeborenen Kälber. Die Milchkuhe werden ganzjährig im Zweiraum-Tieflaufstall mit Auslauf und perforiertem Fressplatz gehalten. Die Melkung erfolgt im Doppelzweier-Autotandem-Melkstand. Die Tiere werden mit einer Mischration über Futtermischwagen und mit Milchleistungsfutter über 2 Abrufstationen gefüttert.

Die Haltung der Kälber dieser Milchkuhe erfolgt in Einzelboxen auf Stroh, ab etwa der fünften Lebenswoche in Gruppenhaltung ebenfalls in Boxen auf Stroh. Die Kälber bleiben unmittelbar nach der Geburt einige Stunden oder bis zu drei Tage beim Muttertier und erhalten auf diese Weise maternales Kolostrum. Bis zum 8. Tag werden die Kälber weiter mit Muttermilch, anschließend mit Milchaustauscher (MAT) gefüttert, wobei ihnen zusätzlich Heu und Kraftfutter in Pellettfarm angeboten wird. Ab etwa der zwölften Lebenswoche erfolgen das Absetzen der Kälber von der MAT-Tränke und die Umstellung auf eine Mischration und Heu. Im Alter von sechs Monaten werden die Jungrinder zu Gruppen à 10-20 Tiere im Tieflaufstall gehalten. Nach der Abkalbung erfolgt die Umstellung der Kühe in den Milchkuhstall. Die männlichen Kälber der Milchkuhe werden üblicherweise im Alter von drei Wochen verkauft, so dass sie für eine weitere Beprobung in der Regel nur wenige Wochen zur Verfügung standen.

Weiterhin wurden auch einzelne Proben von Mutterkühen sowie ihren Kälbern entnommen. Diese werden im Winterhalbjahr im Tieflaufstall gehalten und erhalten Mischration sowie Raufutter. Im Sommerhalbjahr erfolgt die Haltung auf der Weide, z.T. mit Zufütterung von Raufutter. Diese Kälber bleiben bis zum Ausscheiden aus der Herde ständig beim Muttertier.

1.2 Entnahmezeitpunkte und Probenplan

1.2.1 Muttertiere

Die Tiere wurden ca. 8 bis 4 Wochen vor der Kalbung beprobt. War dies nicht möglich, erfolgte die Beprobung der Tiere 6 bis 8 Wochen nach der Abkalbung in der aktuellen Laktationsperiode. Es wurden jeweils Blut für die Gewinnung von Serum sowie Kot entnommen. Unmittelbar nach der Geburt (bis 12 h p.p.) erfolgte die Gewinnung von Kolostrum sowie die Entnahme einer weiteren Kotprobe. Innerhalb der ersten vier Wochen nach der Kalbung wurde den Muttertieren außerdem Milch entnommen (Abb. 1).

1.2.2 Kälber

Bei den neugeborenen Kälbern wurde eine Blutprobe zur Serumgewinnung wenn möglich vor der ersten Kolostrumaufnahme entnommen. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt erfolgte die Entnahme einer postkolostralen Serumprobe. Die Kälber wurden bis zum Erreichen der 12. Lebenswoche wöchentlich, danach bis zur 24. Lebenswoche 14-tägig beprobt. Zu jedem Entnahmezeitpunkt wurde auch eine Kotprobe entnommen (Abb. 1). Die erstmalige Entnahme von Kot nach der Geburt der Kälber erfolgte in der Regel innerhalb von 24 Stunden, da bei der ersten Beprobung noch kein Darminhalt vorhanden war. War zu diesem Zeitpunkt Mekonium vorhanden, wurde dieses entnommen.

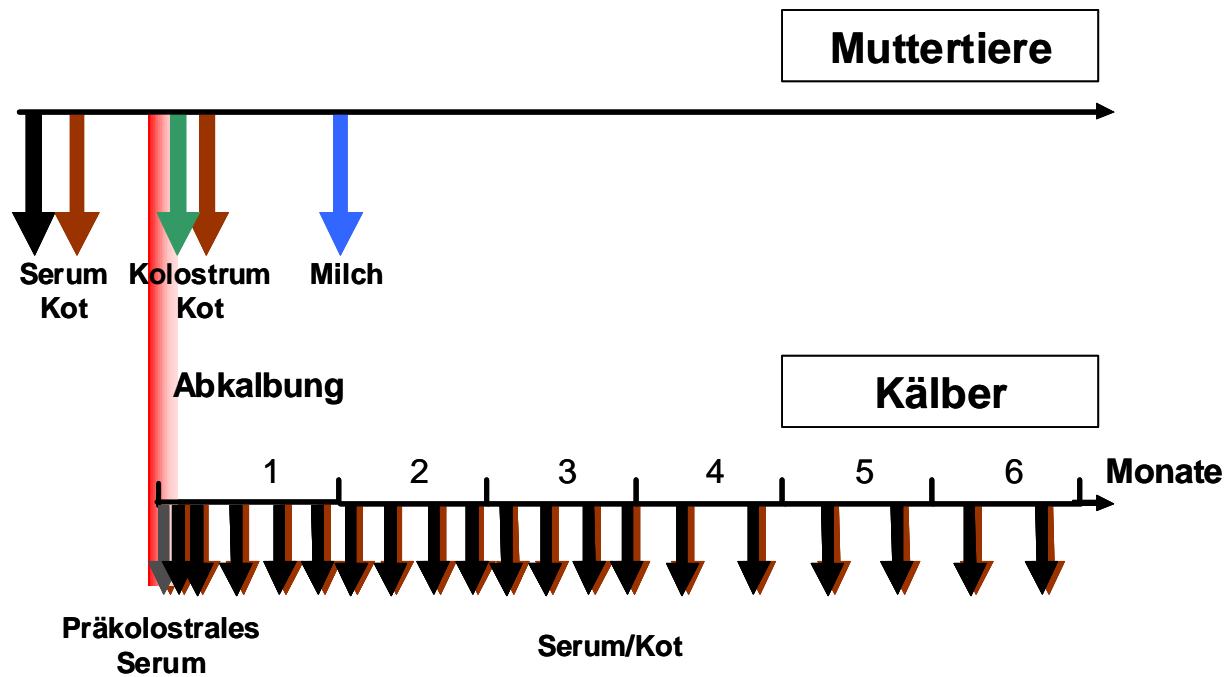


Abb. 1: Schematische Darstellung des Studiendesigns

1.2.3 Weitere Tiere

Bei Tieren, die älter als 6 Monate waren und im Tieflaufstall gehalten wurden, erfolgte jeweils die Entnahme von Blut und Kot.

1.3 Probenentnahme

1.3.1 Blutproben zur Serumgewinnung

Bei Kälbern und Muttertieren wurde die Entnahme von Blut nach Desinfektion der Entnahmestelle durch Punktion aus der *Vena jugularis*, bei weiteren Tieren durch Punktion der Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) vorgenommen. Das Blut wurde in sterilen 10 ml-Plastikröhrchen mit Serumgerinnungsaktivator (Fa. Sarstedt) aufgefangen, kurz durchschwenkt und nach dem Transport bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Pro Tier und Entnahmezeitpunkt wurden 5-10 ml Blut entnommen.

1.3.2 Kolostrum

Die Entnahme von Kolostrum erfolgte nach Desinfektion der entsprechenden Zitze von Hand in ein steriles 50 ml Plastikgefäß (Fa. Greiner Bio-One). Das Kolostrum wurde nach dem Transport bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Pro Tier wurden etwa 30-50 ml Kolostrum entnommen.

1.3.3 Milch

Milchproben wurden im Melkstand vor dem Melkvorgang und nach Reinigung und Desinfektion der Zitze vom Melkpersonal von Hand entnommen. Die Proben wurden ebenfalls in sterilen 50 ml Plastikgefäßen aufgefangen und nach dem Transport bei 4 °C gelagert. Pro Tier wurden etwa 50 ml Milch entnommen.

1.3.4 Kot

Pro Tier und Entnahmezeitpunkt wurden ca. 15 g Kot entnommen. Die Kotproben wurden mit Hilfe eines sterilen Handschuhs manuell aus dem Rektum entnommen und in ein steriles Schnappdeckelgefäß (15 ml, Fa. Greiner Bio-One) überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Kotproben bei -70 °C gelagert.

1.4 Probenaufbereitung

1.4.1 Gewinnung von Serum aus Blutproben

Die Blutproben wurden für 1-2 h bei 4 °C gelagert und abzentrifugiert (3290 x g, 10 min, 20 °C, Zentrifuge Sigma 4K15). Das Serum wurde mit einer sterilen Plastikpipette abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) aliquotiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

1.4.2 Verarbeitung von Kolostrum- und Milchproben

Kolostrum- und Milchproben wurden nach der Entnahme mehrfach abzentrifugiert (3290 x g, 10 min, 20 °C, Sigma 4K15). Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden die Proben von der aufgerahmten Fettschicht und dem Pellet getrennt. Dazu wurde zunächst die Rahmschicht mit

einer sterilen Plastikpipette entfernt und der verbleibende Überstand vorsichtig in ein neues 50 ml Plastikröhrchen (Fa. Greiner Bio-One) dekantiert. Dieser Vorgang wurde je nach Gehalt an Fett und Festbestandteilen in der Probe bis zu 5-mal wiederholt. Die „wässrige/seröse“ Phase des Kolostrums/der Milch wurde mit sterilen Plastikpipetten entnommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2 Zellkulturmethoden

2.1 Zelllinien

Zur Überprüfung der Zytotoxizität von Stx1 und Stx2 (Fa. Sigma-Aldrich) sowie zur Überprüfung des Vorhandenseins Stx-spezifischer, neutralisierender Antikörper wurden Verozellen verwendet (Kapitel 3.1). Diese adhärente Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, # CRL 1587, LGC-Promochem GmbH, Wesel) bezogen. Sie stammt ursprünglich von Nierenkarzinomzellen der grünen Meerkatze (129). Bei HEp2 (Clone2b)-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende humane Larynxkarzinomzellen (HEp = humanes Larynxkarzinom-Epithel), die ebenfalls bei der ATCC (# CCL23, LGC-Promochem GmbH) bezogen wurden.

Verozellen und HEp2 (Clone2b)-Zellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (80 cm², Fa. Nunc) kultiviert (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1 (RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertes Fötales Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin-Streptomycin). Zum Ernten der Zellen bei Einsatz in Tests bzw. zur Ausdünnung der Zellen zur Weiterkultivierung wurden zunächst die Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit 10 ml HEPES-Puffer entfernt. Anschließend wurden jeweils 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung zu den Zellen gegeben und diese für 10 min im Brutschrank bis zur Ablösung des Monolayers inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen in 50 ml Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt und das gleiche Volumen an FKS-haltigem Medium nach Ausspülen der Kulturgefäße hinzugefügt. Dann erfolgte eine 7-minütige Zentrifugation bei 202 x g und 20 °C (Zentrifuge Sigma 4K15). Nach dem Dekantieren des Überstandes konnten die Zellpellets in jeweils 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzählung entnommen werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer.

Die für den jeweiligen Test erforderliche Zellzahl wurde durch die Zugabe von Zellkulturmedium eingestellt.

Für Adhäsionsversuche wurden HEP2-Zellen 4 Tage vor Testbeginn auf 12-Well-Plastikschalen (Fa. Nunc / Fa. Costar) ausgesät und mit Zellkulturmedium 1 (1 ml /Vertiefung) weiter kultiviert.

2.2 Gewinnung und Kultivierung von primären, bovinen Kolonkryptenzellen

Die Kolonkriptenpräparation wurde in Anlehnung an die von Föllmann und Birkner etablierte Methode durchgeführt (73). Das Darmmaterial zur Gewinnung der primären bovinen Kolonzellen stammte von Schlachtrindern des Gießener Schlachthofes. Dort wurden während des Schlachtprozesses jeweils etwa 30 cm lange Abschnitte des proximalen *Colon ascendens* von 18 bis 24 Monate alten Rindern verschiedener Rassen, beiderlei Geschlechts kurz nach der Tötung entnommen. Nach dem manuellen Ausstreifen des Darminhaltes von kranial nach kaudal erfolgte ein mehrmaliges (3- bis 4-mal) Waschen mit steriler, 4 °C kalter NaCl-Lösung (0,9 %), um das Darmstück grob zu reinigen. Dann wurde das sichtbare Fettgewebe mit einer Schere abgesetzt, der Darm längs eröffnet und Farbe sowie Zustand der Mukosa kontrolliert. Nach weiteren (2-3) Waschungen mit steriler, 4 °C kalter Kochsalzlösung (0,9 %) wurde der auf der Schleimhautoberfläche befindliche Mukus vorsichtig mit Hilfe eines Glasobjektträgers abgeschabt und das Darmstück anschließend mehrfach in 6 Liter steriler NaCl-Waschlösung gespült. Der Transport vom Schlachthof in das Labor erfolgte auf Eis in sterilem Transportmedium (PBS mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Gentamicin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 4 mM L-Glutamin und 0,2 % Glukose). Der Zeitraum zwischen Vorbehandlung am Schlachthof und der Weiterverarbeitung im Labor betrug maximal 60 min.

Unter der Sterilbank wurde das Darmstück mit der Schleimhaut nach oben auf ein von steriler Alufolie bedecktes, festes Eisbett in einer Styroporunterlage gelegt. Mit Hilfe von zwei Glasobjektträgern wurde dann die Mukosa abgeschabt, in zwei mit eiskaltem HBSS gefüllte Petrischalen überführt und schließlich mit einer Rasierklinge in sehr feine Gewebstückchen zerschnitten. Die breiartig zerkleinerte Mukosa wurde in acht 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner Bio-One) verteilt und mit eiskaltem HBSS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die erste Waschung in der Zentrifuge (130 x g, 5 min, 4 °C, Sigma 4K15). Der Mukosa-Brei teilte sich dabei in Überstand, Mukus und Gewebepellet. Überstand und Mukusschicht wurden mittels Pasteurpipette und Schlauchpumpe (easy-load Masterflex®,

Fa. Millipore) abgesaugt. Danach wurden die Röhrchen wieder auf 50 ml mit eiskaltem HBSS aufgefüllt und die Waschschriffe in der Zentrifuge so lange wiederholt, bis die Mukusschicht weitestgehend vom Gewebepellet entfernt worden war. Dann wurden die Pellets für den enzymatischen Aufschluss gepoolt. 30 ml Pellet wurden zu 120 ml Verdau-Lösung (60 ml DMEM, 60 ml HBSS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 2,5 µg/ml Gentamicin, 150 U/ml Collagenase I, CLS; 37 °C vorgewärmt) in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben und bei 100 U/min, 37 °C und 8 % CO₂ im Brutschrank auf einem Magnetprüher (Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co. KG) für 45 min inkubiert (1. Verdau). Danach wurde die Zellsuspension zweimal mit einer 30 ml Spritze durch 0,6 x 25 mm Kanülen gepresst, um durch mechanische Kräfte die Zerkleinerung der Zellklumpen zu unterstützen. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 10 min auf dem Magnetprüher im Brutschrank (2. Verdau). Danach wurde die Verdau-Lösung auf 12 Röhrchen aufgeteilt, diese auf 50 ml mit eiskaltem HBSS aufgefüllt und bei 202 x g, 7 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die trübe Enzym-Lösung über dem Zellpellet konnte nun mit der Pasteurpipette abgesaugt werden und wurde anschließend verworfen. Um die Epithelzellkrypten von den Einzelzellen zu trennen, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden die Röhrchen mit den Pellets (bestehend aus Epithelzellkrypten und Einzelzellen der *Lamina propria mucosae*) unter vorsichtigem Schwenken mit Sorbitol-Lösung (2%-ig in HBSS, eiskalt) auf 50 ml aufgefüllt und dann in der vorgekühlten Zentrifuge bei 50 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Zur mikroskopischen Kontrolle des Zellbildes im Überstand wurde ein Tropfen des Überstandes auf einen Objektträger gegeben und die Menge an Einzelzellen visuell abgeschätzt. Die aus den schwereren Epithelzellkrypten gebildeten Pellets wurden mit einer 10 ml Glaspipette sorgfältig aufgesaugt und solange innerhalb der Pipette gehalten, bis der verbleibende Überstand aus dem Röhrchen entfernt worden war. Danach wurde das Pellet in das Röhrchen zurückgegeben und das Volumen mit eiskalter Sorbitol-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Es schlossen sich jeweils bis zu vier weitere Sorbitol-Dichtegradienten-Zentrifugationen an, wobei jedes Mal das Pellet mit der Pipette aufgesaugt, in das entleerte Röhrchen zurückgegeben, das Volumen mit der Sorbitol-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und das Zellbild im Überstand kontrolliert wurde. Normalerweise nahm die Zahl der Einzelzellen von Gradient zu Gradient ab, das Auftreten von Epithelzellkrypten im Überstand wurde als Zeichen zur Beendigung der Prozedur gewertet. Schließlich wurden die Kryptenpellets gepoolt und zu gleichen Teilen mit DMEM-Medium (Fa. Gibco) versetzt. Vor der endgültigen Aussaat sollte zuerst die Anzahl der Epithelzellkrypten in der Lösung bestimmt werden. Zum Auszählen der gewonnenen Krypten wurden 20 µl der Suspension auf

einen Objektträger gegeben und mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen bedeckt. Bei mäanderförmiger Durchmusterung erfolgte die Zählung aller Krypten unter dem Mikroskop. Das Ergebnis wurde auf ein Volumen von 1 ml bezogen.

Die Kultivierung der primären bovinen Kolonkryptenzellen erfolgte in 12-Well-Plastikschalen (Fa. Corning Costar) wobei nach der Gewinnung 300 bis 400 Krypten pro cm² ausgesät wurden. Um das Auswachsen der Kryptenzellen zu fördern, wurden die Kulturgefäße am Vortag mit Collagen beschichtet (2,8 µl/cm², CollagenR, Fa. Serva, eingesetzt 1:10 verdünnt in autoklaviertem *A. dest.*). Als Kulturmedium diente supplementiertes Dulbecco's Modified Eagle's-Medium (Zellkulturmedium A). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 8 % CO₂ und Wasserdampfsättigung.

Am Tag 1 nach der Präparation erfolgte ein Mediumwechsel, um die zahlreichen Zelltrümmer sowie die nicht angewachsenen Krypten aus dem Überstand zu entfernen. Das nun für die weitere Kultivierung verwendete Medium enthielt nur noch 2 % FKS und wurde mit 0,5 % Rinderhypophysenextrakt (Fa. c.c. pro GmbH) supplementiert (Zellkulturmedium B).

3 Nachweis von Stx-spezifischen Antikörpern in Serum-, Kolostrum- und Milchproben

3.1 Verozelltest

3.1.1 Prinzip des Neutralisationstestes

Zur Überprüfung des Vorhandenseins von Stx-spezifischen Antikörpern in unterschiedlichem Probenmaterial wurde der Verozell-Neutralisationstest (Vero-NT) eingesetzt. Dabei wurde das Testsystem nach Gentry und Dalrymple (82) zum Nachweis der Zytotoxizität von Stx modifiziert. Der Test wurde jeweils im Mikrotiterformat in 96-Well-Platten (Fa. Nunc) durchgeführt und ausgewertet. Als zu untersuchende Proben dienten die aufbereiteten Serum-, Kolostrum- und Milchproben. Die Serumproben wurden vor dem Einsatz im Vero-NT bei 56 °C für 30 min im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Der Zellkulturtest setzte sich aus drei Komponenten à 50 µl Flüssigkeitsvolumen zusammen, welche nacheinander in die Mikrotiterplatten pipettiert wurden.

1. Komponente

Sie enthielt die auf Stx1/Stx2-spezifische neutralisierende Antikörper zu testende Probe, welche 1:10 in Zellkulturmedium 1 (RPMI 1640, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) vorverdünnt und anschließend in einer log 3-Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium 2 (RPMI 1640, 20 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) titriert wurde. Im Falle der Positiv- und Negativkontrolle wurden in dieser Komponente ausschließlich 50 µl Zellkulturmedium 2 eingesetzt.

Für den Nachweis von neutralisierenden Stx1-spezifischen Antikörpern in Serum- und Kolostrumproben erfolgte die Titration über 8 Stufen, so dass sich ein Verdünnungsbereich (bei 150 µl Endvolumen/Vertiefung) von 1:30 bis 1:65610 ergab. Die erste Verdünnungsstufe (1:30) wurde für diese Proben zweimal auf der Platte angeordnet.

Im Falle von Milchproben, beim Nachweis Stx2-spezifischer neutralisierender Antikörper in Serum und Kolostrumproben sowie beim Nachweis Stx2c-spezifischer Antikörper in Kolostrumproben wurden alle Proben ausschließlich 1:10 in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt, so dass stets eine Verdünnung der Proben von 1:30 je Vertiefung vorlag.

Jede Verdünnungsstufe wurde im Dreifachansatz getestet. Die Kontrollen waren den Testansätzen benachbart auf der Mikrotiterplatte angeordnet.

2. Komponente

In dieser Komponente wurde Stx1 bzw. Stx2 (Fa. Sigma-Aldrich) sowie ein Stx2c-haltiges *E. coli*-Gesamtlysat (Kapitel 3.2.2) gelöst in Zellkulturmedium 1 in einer Konzentration von 4 CD₅₀/Vertiefung bzw. 80 CD₅₀/ml eingesetzt. Das toxinhaltige Medium wurde zur Positivkontrolle sowie zu den Testansätzen (s.o.) gegeben. Die Negativkontrolle sowie einer der beiden Probenansätze in der Verdünnungsstufe 1:30 wurden dagegen ausschließlich mit Zellkulturmedium 1 versetzt.

3. Komponente

Sie enthielt eine Verozellensuspension in Zellkulturmedium 1, eingestellt auf eine Zellzahl von 4×10^4 Zellen/Vertiefung.

In die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Inkubation des Testes erfolgte für 96 Stunden (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung).

3.1.2 Prinzip des Zytotoxizitätstestes

Um die Zytotoxizität des verwendeten Stx1/Stx2 sowie die Zytotoxizität der im Vero-NT verwendeten Toxingebrauchslösung (auf 80 CD₅₀ Stx1 bzw. Stx2/ml eingestelltes Zellkulturmedium 1) zu kontrollieren, wurde ein Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT), modifiziert nach Gentry und Dalrymple (82), herangezogen. Der Zytotoxizitätstest erfolgt wie der Vero-NT im Mikrotiterformat unter der Verwendung von Verozellen, wobei ebenfalls 3 Komponenten à 50 µl folgendermaßen befüllt werden:

1. Komponente

Sie enthielt die auf Zytotoxizität zu überprüfende Probe, welche in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt und anschließend in Zellkulturmedium 1 logarithmisch ausverdünnt wurde. Die Positivkontrolle wurde mit je 50 µl eines 1:10 in Zellkulturmedium 1 verdünnten *E. coli*-Gesamtlysates (Ultraschall-Lysat *E. coli* Stamm 2403, Tab. 7) versetzt, die Negativkontrolle enthielt in dieser Komponente ausschließlich Zellkulturmedium 1. Bei der Überprüfung der Zytotoxizität des verwendeten Stx1 bzw. Stx2 (Fa. Sigma-Aldrich) wurde dieses zunächst 1:1000 in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt und anschließend in log₁₀-Stufen in 9 Schritten in Zellkulturmedium 1 titriert.

Im Falle der Überprüfung der Zytotoxizität der eingestellten Toxinlösung aus dem Verozell-NT wurde die für den Test frisch angesetzte Toxingebrauchslösung (eingestellt auf 80 CD₅₀/ml) in Zweierstufen logarithmisch in Zellkulturmedium 1 ausverdünnt. Hier enthielt die Positivkontrolle ebenfalls je 50 µl eines 1:10 in Zellkulturmedium 1 verdünnten *E. coli*-Gesamtlysates (Ultraschall-Lysat *E. coli* Stamm 2403, Tab. 7), die Negativkontrolle in dieser Komponente 50 µl Zellkulturmedium 1. Jede untersuchte Probe wurde in allen vorliegenden Verdünnungsstufen im Dreifachansatz getestet. Die Kontrollen waren den Testansätzen benachbart auf der Mikrotiterplatte angeordnet.

2. Komponente

In dieser Komponente wurden jeweils 50 µl Zellkulturmedium 2 zu allen Vertiefungen gegeben.

3. Komponente

Sie enthielt eine Verozellsuspension in Zellkulturmedium 1, eingestellt auf eine Zellzahl von 4×10^4 Zellen/Vertiefung.

In die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Inkubation des Testes erfolgte für 96 Stunden (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung).

3.1.3 Auswertung

Zytostatische und zytotoxische Effekte im Zellkulturtest wurden durch einen kolorimetrischen Test unter Verwendung eines Farbstoffes quantifiziert, der nur von lebenden Zellen reduziert wird. Dieser Farbstoff, ein Tetrazoliumsalz, 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Fa. Sigma-Aldrich), wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem violettfarbenen Formazan umgesetzt. Der im MTT-Test bestimmte Parameter wird als „Stoffwechselaktivität“ bezeichnet. Der Test wurde in der Modifikation von Tada *et al.* durchgeführt (277).

Am Ende der Inkubationsdauer des Vero-NT/ZT wurden zu jedem Ansatz in der Mikrotiterplatte 25 µl der MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) pipettiert und die Platte unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert (4 h, 37 °C). Zum Abstoppen der Reaktion durch Zerstörung der Zellen und zum Lösen des in wässriger Lösung unlöslichen Formazans erhielt jede Vertiefung 100 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung. Anschließend wurde die Inkubation über Nacht fortgeführt. Die Messung der Extinktionsdifferenzen (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Vertiefungen erfolgte mit einem ELISA-Platten-Lesegerät (Multiscan Ascent, Fa. Labsystems). Die absolute optische Dichte (OD_{abs}) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

$$OD_{abs} = [OD_{Ansatz\ 1} + OD_{Ansatz\ 2} + OD_{Ansatz\ 3}] / 3$$

Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen wurde in Bezug zur Positiv- (OD_{pos}) und Negativkontrolle (OD_{neg}) in der jeweiligen Mikrotiterplatte standardisiert. Dabei diente die folgende Formel der Ermittlung der relativen optischen Dichte OD_{rel}:

$$OD_{rel} = (OD_{abs} - OD_{pos}) / (OD_{neg} - OD_{pos}) \times 100$$

3.1.4 Berechnung der verozytotoxischen/inhibitorischen Dosis 50 %

3.1.4.1 Berechnung der verozytotoxischen Dosis 50 %

Zur Auswertung des Verozell-ZT wurde die „verozytotoxische Dosis 50 %“ pro Milliliter (CD_{50}/ml) geometrisch ermittelt. Dazu wurde zunächst die Stoffwechselaktivität von Verozellen (relative Zellaktivität, OD_{rel}) nach Titration mit Stx1 bzw. Stx2 gegen die log-Verdünnungsstufen der zu bestimmenden Probe gezeichnet (Abb. 2 A).

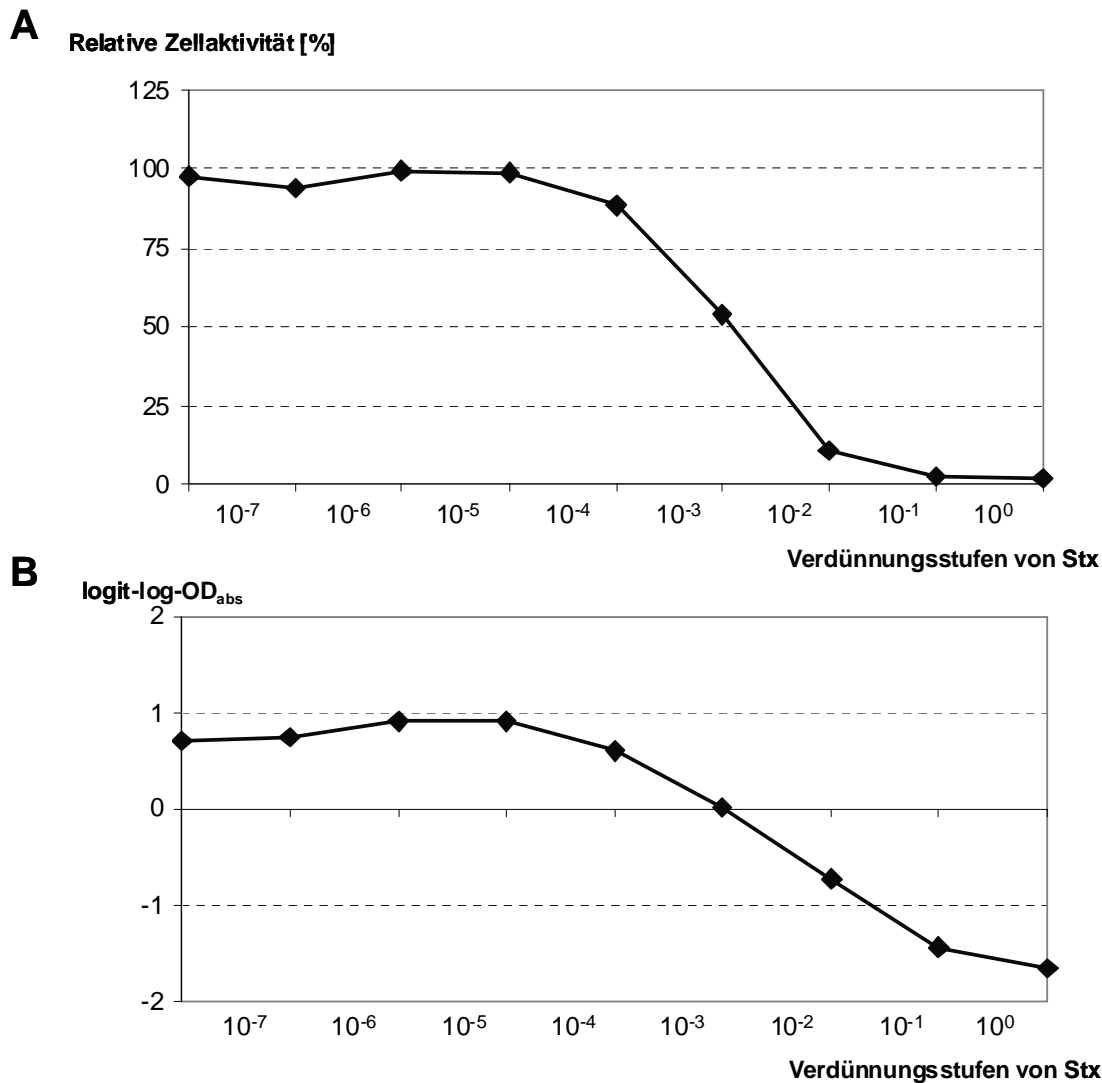


Abb. 2: Hypothetischer Kurvenverlauf nach einer log₁₀-Titration von Stx

Darstellung der ermittelten Zellaktivität (**A**): Aufgetragen ist die relative Zellaktivität [%] gegen die entsprechenden log-Verdünnungsstufen des titrierten Stx. Graphische Darstellung der zugehörigen OD_{abs} -Werte nach logit-log-Transformation (**B**): In die Berechnung zur Ermittlung des Schnittpunktes der Geraden mit der x-Achse (entspricht der Toxinverdünnung, bei der eine 50 %-ige Zellaktivität vorliegt) gehen zwei Logit-log- OD_{abs} -Werte ober- und unterhalb des Schnittpunktes mit der x-Achse ein.

Anschließend wurden die ermittelten OD_{abs}-Werte einer logit-log-Transformation unterzogen, um eine Linearisierung des mittleren Abschnittes dieser Kurve zu erreichen (Berechnung mit Microsoft® Excel 2003). Als Untergrenze (UG) wurde die OD_{abs} der Positivkontrolle (OD_{pos}) eingesetzt, sofern alle OD_{rel}-Werte der Proben $\geq 0\%$ lagen. War dies nicht der Fall wurde der kleinste OD_{abs}-Wert minus 0,001 als Untergrenze festgesetzt. Als Obergrenze (OG) wurde die OD_{abs} der Negativkontrolle (OD_{neg}) eingesetzt, falls alle OD_{abs}-Werte der Proben einen Wert $\leq 100\%$ aufwiesen. Traf dies nicht zu, wurde der größte OD_{abs}-Wert plus 0,001 als Obergrenze definiert. Die logit-log-Transformation aller OD_{abs}-Werte erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{logit-log-OD}_{\text{abs}} = \log_{10} [(OD_{\text{abs}} - UG) / (OG - OD_{\text{abs}})]$$

Abb. 2 B zeigt den hypothetischen Kurvenverlauf nach logit-log-Transformation der OD_{abs}-Werte eingetretene Linearisierung der Zellaktivitätskurve im mittleren Kurvenabschnitt. Im nächsten Schritt wurde anhand der ermittelten logit-log-OD_{abs}-Werte der Kurvenabschnitt ermittelt, bei dem eine 50 % relative Zellaktivität vorlag. Dies entspricht dem Schnittpunkt der nach logit-log-Transformation linearisierten Kurve mit der x-Achse (Abb. 2 B). Dazu wurden zwei Messwerte oberhalb und zwei Messwerte unterhalb dieses Schnittpunktes zur Berechnung der Toxinkonzentration CD₅₀/ml herangezogen. Es wurden nur dann weniger Messwerte in die Berechnung einbezogen, wenn Werte innerhalb der linearisierten Kurve nicht kontinuierlich anstiegen (Editierung der logit-log-transformierten Werte).

Mittels Microsoft® Excel 2003 wurden anschließend die Steigung „m“ und der y-Achsenabschnitt „b“ des entsprechenden Kurvenabschnittes mit den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Steigung } m = \text{INDEX}(\text{RGP}(A:B;C:D);1)$$

$$\text{Y-Achsenabschnitt } b = \text{INDEX}(\text{RGP}(A:B;C:D);2)$$

Dabei war A die kleinste gültige logit-log-OD_{abs}, B die größte gültige logit-log-OD_{abs}, C die log-Verdünnungsstufe der kleinsten gültigen logit-log-OD_{abs} und D die log-Verdünnungsstufe der größten gültigen logit-log-OD_{abs}. Als log-Verdünnungsstufen wurden bei diesem Rechenschritt die Exponenten der jeweiligen log-Verdünnungsstufe eingesetzt (z.B. -2 bei der Verdünnungsstufe 10⁻²).

Mit „m“ und „b“ wurde dann die Toxinkonzentration in CD_{50} /Vertiefung mit der Formel

$$CD_{50}/\text{Vertiefung} = x^{(b/m)}$$

berechnet. X stellt in diesem Fall den Modus der logarithmischen Verdünnung, z.B. 10 bei einer \log_{10} -Verdünnungsreihe, dar. Dieser Schritt ermöglichte es, die \log -Verdünnungsstufe zu extrapolieren, bei der die transformierte Kurve die x-Achse schneidet, d.h. die Zellaktivität auf genau 50 % reduziert worden wäre.

Nachfolgend wurde durch Multiplikation des errechneten Wertes mit 20 die Toxinkonzentration in CD_{50} /ml ermittelt:

$$CD_{50}/\text{ml} = CD_{50}/\text{Vertiefung} \times 20$$

Diese Berechnung wurde für die einmalig hergestellten und aliquotierten Toxinlösungen (Stx1 bzw. Stx2 1:1000 in Zellkulturmedium 1) auf jeder neu aufgetauten Charge von Verozellen durchgeführt. Der dabei ermittelte CD_{50} -Wert diente der Berechnung der benötigten Menge dieser Ausgangslösung für die 80 CD_{50} /ml-Toxingebrauchslösung im Vero-NT. Ebenfalls nach dieser Methode wurde der CD_{50} -Wert dieser im NT eingesetzten Stx1/Stx2-Gebrauchslösungen berechnet und so deren korrekte Einstellung auf 4 CD_{50} /Vertiefung bzw. 80 CD_{50} /ml überprüft. Diese Rücktitration der Toxingebrauchslösung erfolgte insgesamt 9-mal für die Stx1- und 5-mal für die Stx2-Gebrauchslösung. Dabei betrug der Mittelwert aus allen Untersuchungen 3,7 CD_{50} /Vertiefung bzw. 75 CD_{50} /ml für die Stx1-Gebrauchslösung und 3,4 CD_{50} /Vertiefung bzw. 68 CD_{50} /ml für die Stx2-Gebrauchslösung.

Auf diese Weise wurden auch die CD_{50} -Werte von Stx-haltigen *E. coli*-Ultraschall-Lysaten (3.2.2) berechnet, um eine Aussage über deren Verozell-Zytotoxizität zu erhalten. Der CD_{50} -Wert des Stx2c-haltigen Lysates (Stamm E23511/HSC, Tab. 8) diente gleichzeitig dazu, die benötigte Menge dieses Lysates für die Herstellung einer 4 CD_{50} -haltigen Lösung zu berechnen. Die mit Zellkulturmedium 1 eingestellte Lösung wurde dann im Verozell-Neutralisationstest zum Nachweis Stx2c-spezifischer Antikörper in den Kolostrumproben eingesetzt.

3.1.4.2 Berechnung der inhibitorischen Dosis 50 %

Bei der Auswertung des Neutralisationstestes wurde nach mikroskopischer Kontrolle und Durchführung des MTT-Tests die „Inhibitorische Dosis 50 %“ (ID_{50}) ermittelt. Bei der Bestimmung des ID_{50} -Wertes wurde nach dem gleichen Prinzip, wie bei der Berechnung des CD_{50} -Wertes im Vero-ZT, vorgegangen. Allerdings erfolgte beim Vero-NT eine Austitration der Probe (Serum, Milch oder Kolostrum), während das Toxin stets in der gleichen Konzentration (4 CD_{50} /Vertiefung bzw. 80 CD_{50} /ml) zugeführt wurde. Somit wurde diejenige Serumverdünnung bestimmt, bei der die Wirkung von 80 CD_{50} Stx/ml zu 50 % inhibiert wurde. Der errechnete Wert wurde als ID_{50} bezeichnet und entspricht dem Stx-Neutralisationstiter der untersuchten Probe.

Durch Exponation des ermittelten Achsenabschnittes, bei dem die x-Gerade geschnitten wird, zum Faktor der logarithmischen Verdünnung (x) konnte die log-Verdünnungsstufe angegeben werden, bei der 50 % Zellaktivität erreicht wurden. Das Ergebnis dieser Berechnung entsprach nach Multiplikation mit dem Faktor 10 (da die Proben in der ersten Komponente des Neutralisationstestes bereits 1:10 vorverdünnt eingesetzt wurden) dem Reziprokwert derjenigen Probenverdünnungsstufe, bei der eine Toxinkonzentration von 80 CD_{50} /ml genau um 50% inhibiert wird:

$$ID_{50} = 10 * x^{(b/m)}$$

x stellt den Modus der logarithmischen Verdünnung, z.B. 3 bei einer log3-Verdünnungsreihe dar. Der errechnete Wert der ID_{50} wurde als Stx-Neutralisationstiter einer Probe definiert.

3.1.4.3 Nachweisgrenze sowie Definition von Titerabfall und Titeranstieg

Die Berechnung des Neutralisationstiters erfolgte für eine Probe nur dann, wenn in ihrer ersten Verdünnungsstufe eine relative Zellaktivität von mindestens 50 % erreicht wurde. Somit lagen alle errechneten Titerwerte stets über einem Wert von 30, was dem Reziprokwert der kleinsten Verdünnungsstufe (1:30) entspricht. Proben, die keine relative Zellaktivität von mindestens 50 % in der ersten Verdünnungsstufe erreichten, wurden als negativ im Sinne des Neutralisationstests angesehen.

Als Nachweisgrenze des Vero-NT wurde der kleinste mögliche Neutralisationstiter festgelegt. Sie lag demnach bei 30. Alle Proben die diesen Neutralisationstiter nicht erreichten, wurden als negativ im Sinne des Vero-NT angesehen, und mit der Hälfte des kleinsten möglichen Neutralisationstiters, also mit 15 bewertet.

Bei den Proben, die ausschließlich in einer Verdünnung von 1:30 (Endkonzentration je Vertiefung) getestet wurden, wurde der Neutralisationstiter als der reziproke Wert dieser Verdünnungsstufe (= 30) definiert, wenn die relative Zellaktivität über 50 % im Falle von Stx1-spezifischen Antikörpern und 30 % im Falle von Stx2- und Stx2c-spezifischen Antikörpern lag.

Ein Titerabfall bei hintereinander entnommenen Serumproben ein und desselben Tieres lag dann vor, wenn der Neutralisationstiter an zwei aufeinander folgenden Entnahmezeitpunkten um mindestens eine log-Stufe niedriger lag als der letzte vorher ermittelte Titer oder wenn an zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten die relative Zellaktivität in keiner Verdünnungsstufe 50 % erreichte.

Eine Serokonversion bei hintereinander entnommenen Serumproben ein und desselben Tieres lag dann vor, wenn der Neutralisationstiter an zwei aufeinander folgenden Entnahmezeitpunkten um mindestens zwei log-Stufen höher lag als der letzte vorher ermittelte Titer.

3.2 ELISA

3.2.1 Durchführung des Stx-ELISA

Zum Nachweis von freiem Stx1/Stx2 in Kotproben wurde ein kommerziell erhältlicher qualitativer Mikrotiter-Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Shigatoxinen (Stx1 und Stx2) in humanen Stuhlüberständen oder angereicherter Kultur (Novitec® Verotoxin Test, Fa. Hiss Diagnostics) verwendet. Das Testkit besteht aus Mikrotiterkavitäten, die mit polyklonalem Anti-Stx (Stx1 und Stx2)-Antikörpern beschichtet sind. Das in den fraglichen Proben vorhandene Stx wird während einer 20-minütigen Inkubationszeit mittels dieser Antikörper an die Festphase gebunden. Überschüssiges Probenmaterial wird anschließend durch viermaliges Waschen entfernt. In einem weiteren Schritt binden monoklonale Anti-Stx-Antikörper in Puffer mit Thimerosal (Reagenz 1) an die Antigen-Antikörperkomplexe der

Festphase. Anschließend folgen weitere vier Waschschr tte (Waschpuffer mit Thimerosal) sowie die Zugabe von HRP (Horseradish-Peroxidase)-markierten Anti-Maus-Immunglobulinen (in Puffer mit Thimerosal = Reagenz 2) als Konjugat. Die Sichtbarmachung der Reaktion erfolgt nach weiteren 4 Waschschr tten sowie der Zugabe des Substrates, welches aus TMB-Chromogen (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin) in Puffer und Zitronensäure mit Peroxid besteht. Beim Vorliegen von Stx kommt es zu einem Farbumschlag nach blau. Durch Zugabe einer Stopplösung (1 M Phosphorsäure), die die Umwandlung des blauen Chromogens zu einem gelben Chromogen bewirkt, wird die Farbreaktion gestoppt. Die Auswertung des Tests erfolgt visuell sowie spektralphotometrisch, wobei die optische Dichte (OD) (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) mit einem ELISA-Platten-Lesegerät (Multiscan Ascent, Fa. Labsystems) bestimmt wird. Dem Testkit ist eine Stx-positive und -negative Stuhlsuspension als Positiv- bzw. Negativkontrolle beigelegt. Ein Test ist nur dann gültig, wenn die Negativkontrolle eine OD von $< 0,150$ bei 450 nm bzw. 450/630 nm und die Positivkontrolle eine OD von $> 0,500$ bei 450 nm bzw. 450/630 nm aufweist. Der Test verläuft negativ, d.h. es sind keine detektierbaren Mengen an Stx-Antigen im Ansatz enthalten, wenn die Kavitäten keine distinkte gelbe Färbung aufweisen bzw. wenn die ermittelte OD eines Ansatzes $< 0,150$ ist. Ein positives Ergebnis liegt dann vor, wenn die entsprechende Mikrotiterkavit t eine distinkte Gelbfärbung aufweist bzw. die ermittelte OD bei $> 0,150$ liegt.

3.2.2 Herstellung von *E. coli*-Ultraschall-Lysaten

Für den Einsatz im kompetitiven ELISA (3.2.4) wurden Ultraschall-Lysate folgender *E. coli*-Stämme hergestellt (Tab. 7):

Tab. 7: Zur Herstellung von Ultraschall-Lysaten verwendete *E. coli*-Stämme, Eigenschaften und Herkunft

Stamm	Serovar	Virulenzgene	Herkunft	Referenz
2403 (x-0275/99) ¹⁾	rough:H-	<i>stx1</i>	Rind	A, (305)
5720/96 (x-672/05)	026:H11	<i>stx2</i>	Mensch	B
E32511/HSC (x-673/05)	O157:NM	<i>stx2c, eae</i>	Mensch	B
EH 250 (x-674/05)	ONT:H12	<i>stx2d</i>	Mensch	B
RW2169 (SFB5)	O118:H6	<i>eae, espB</i>	Rind	A

Erläuterungen: **A:** Stammsammlung des Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen; **B:** Prof. Dr. Karch, Institut für Hygiene, Münster; **1):** Angaben in Klammern stellen die institutseigenen Tagebuchnummern der Isolate dar.

Am Tag 1 erfolgte die Anzucht der Keime in 10 ml Luria Bertani (LB)-Medium in einem 50 ml Plastik-Reaktionsgefäß (Fa. Greiner Bio-One) für 8 h bei 37 °C und 180 U/min. 5 ml dieser Startkultur wurden dann in einen mit 500 ml LB-Medium befüllten 2 Liter-Erlenmeierkolben überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min unter Schütteln inkubiert.

Am Tag 2 erfolgte die Ernte der Kulturen. Je ein Kulturansatz wurde auf zwei Zentrifugenbecher aufgeteilt. Die Kulturen wurden zunächst zentrifugiert (5000 U/min, 4200 x g, 30 min, RT, Sorvall-Zentrifuge RC 5B Plus). Anschließend wurde der Kulturüberstand verworfen und die beiden Pellets in je 16 ml eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden anschließend in ein 30 ml Schnappdeckelgefäß (Fa. Greiner Bio-One) überführt und auf Eis gelagert. Jeder Ansatz wurde daraufhin mittels Ultraschall 3 mal 20 sek mit einminütiger Unterbrechung auf Eis lysiert (Stufe 6.5, Duty Cycle 70 %). Die Lysate wurden danach erneut zentrifugiert (3291 x g, 60 min, 4 °C, Zentrifuge Eppendorf 5804R). Der Ultraschall-Lysat-Überstand wurde ultrazentrifugiert (100000 x g/39000 U/min, 2 h, 4 °C, Zentrifuge Beckmann L7, Rotor 75Ti). Die Überstände wurden steril entnommen, UV-bestrahlt (1 x 8000 µJoule x 100, UV-Stratalinker 1800, Fa. Stratagene) aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Von jedem Ultraschall-Lysat wurden Sterilkontrollen auf Blutagarplatten angelegt, welche über Nacht bei 37 °C bebrütet und am nächsten Tag auf das Wachstum von Bakterien überprüft wurden.

Die Ultraschall-Lysate wurden außerdem im Verozell-ZT (Kapitel 3.1) auf ihre verozytotoxische Dosis (CD₅₀) hin untersucht. Dazu wurden die Lysate im Dreifachansatz in einer log 10-Verdünnungsreihe in NaCl-Lösung ausverdünn. Die Positivkontrolle erhielt eine 1 %-ige SDS-Lösung, die Negativkontrolle ausschließlich NaCl-Lösung. In der zweiten Komponente erhielten alle Kavitäten 50 µl Zellkulturmedium 1, die dritte Komponente bestand für alle Vertiefungen aus der Zellsuspension in Zellkulturmedium 1. Nach Inkubation und Durchführung des MTT-Tests wurde die CD₅₀/ml der einzelnen Lysate wie beschrieben berechnet.

3.2.3 Überprüfung und Einstellung der Ultraschall-Lysate

Die Untersuchung der wie erläutert hergestellten *E. coli*-Ultraschall-Lysate im Vero-ZT ergab für die einzelnen Stämme folgende CD₅₀-Werte je ml Lysat (Tab. 8):

Tab. 8: Im Vero-ZT ermittelte CD₅₀/ml der *E. coli* Ultraschall-Lysate

<i>E. coli</i> -Stamm	Stx-Typ	CD ₅₀ /ml Lysat
2403 (x0275/99)	Stx1	550820
5720/96 (x-672/05)	Stx2	34820
E32511/HSC (x-673/05)	Stx2c	66590
EH 250 (x-674/05)	Stx2d	7530
RW2169 (SFB5)	-	-

Der CD₅₀-Wert des Stx2c-haltigen Lysates (Stamm E23511/HSC) diene gleichzeitig dazu, die benötigte Menge dieses Lysates für die Herstellung einer 4 CD₅₀-haltigen Lösung zu berechnen. Die mit Zellkulturmedium 1 eingestellte Lösung wurde dann im Verozell-Neutralisationstest zum Nachweis Stx2c-spezifischer Antikörper in den Kolostrumproben eingesetzt.

Die Ausverdünnung der Lysate in Waschpuffer ergab, dass sie für den Einsatz im Präinkubationsgemisch 1:8 ([v:v], für Stamm 2403) bzw. 1:2 ([v:v], für die Stämme 5720/96 und E32511/HSC) in Waschpuffer vorverdünnt werden mussten, um die bei der Durchführung des ELISA angestrebte Ausgangs-OD von etwa 3-3,5 zu erreichen.

Die Untersuchungen ergaben auch, dass die vom Hersteller zur Beschichtung der Mikrotiterkavitäten verwendeten polyklonalen Stx1/Stx2- Antikörper, die Stx2-Variante Stx2d (*E. coli*-Stamm EH 250) nicht detektierten.

3.2.4 Durchführung des kompetitiven ELISA

Das kommerzielle ELISA-Kit (Novitec® Verotoxin Test, Fa. Hiss Diagnostics) konnte aufgrund der voneinander getrennt vorliegenden Einzelkomponenten zu einem kompetitiven ELISA modifiziert werden. Das Prinzip des Testes wurde dahingehend geändert, dass verschiedene Shigatoxine (Stx1, Stx2, Stx2c) welche in Form von *E. coli*-Ultraschall-Lysaten vorlagen, mit den zu testenden Serumproben präinkubiert wurden. Diese Präinkubationslösung wurde auf die beschichteten Mikrotiterkavitäten des Testkits verbracht. Die weiteren Schritte des ELISA entsprachen der beschriebenen Prozedur (3.2.1).

Zunächst wurden die *E. coli*- Ultraschall-Lysate im oben beschriebenen Novitec® Verotoxin-ELISA untersucht (3.2.1). Diese Untersuchung diene dem Nachweis von Stx sowie der

Ermittlung der optimalen Einstellung des Antigengehaltes im Präinkubationsgemisch. Die Lysate wurden entsprechend dieser Ergebnisse 1:8 ([v:v], Stx1-haltiges Lysat) bzw. 1:2 ([v:v], Stx2/Stx2c-haltiges Lysat) in Waschpuffer-Gebrauchslösung (frisch hergestellt aus 1 Teil 20 x Waschpuffer (WP)-Konzentrat und 19 Teilen autoklaviertem *A. dest.*) verdünnt. Diese Lösung wurde zu gleichen Teilen mit 1:10 in Zellkulturmedium 1 vorverdünnten Serumproben gemischt und für 30 min bei 37 °C präinkubiert. Für jede Serumprobe erfolgte außerdem ein Ansatz, bei dem das Stx-haltige Lysat gegen das Lysat eines nicht Stx-produzierenden Stammes (RW2169) ersetzt wurde und zwar im gleichen Verhältnis in Waschpuffer gelöst, wie das entsprechend verwendete Stx-Lysat. Weiterhin diente bei jeder Versuchsreihe ein Ansatz mit Lysat aber ohne Serum als Positivkontrolle. Außerdem wurden die testeigenen Positiv- und Negativkontrollen bei jeder Durchführung des kompetitiven ELISA mitgeführt. Nach der Präinkubation wurden je 100 µl der Lösung in die Mikrotiterkavitäten pipettiert und der ELISA wie beschrieben durchgeführt sowie spektralphotometrisch ausgewertet. Die Differenz der optischen Dichte bei 450 nm (OD_{450nm}) und 690 nm (OD_{690nm}) stellte die absolute optische Dichte für jeden Ansatz dar (OD_{abs}):

$$OD_{abs} = OD_{450nm} - OD_{690nm}$$

Anschließend wurde für jedes untersuchte Serum die relative Optische Dichte (OD_{rel}) bestimmt, wobei die OD_{abs} der Positivkontrolle (Pos, Präinkubationslösung ohne Serum) mit 100 % gleichgesetzt wurde und die OD_{abs} des Serumansatzes mit Stx-freiem-Lysat (oStxLysat) im Präinkubationsgemisch gleich 0 % gesetzt wurde:

$$OD_{rel} = (OD_{abs}Serumansatz - OD_{abs}Serumansatz_{oStxLysat}) / (OD_{abs}Pos - OD_{abs}Serumansatz_{oStxLysat}) \times 100$$

Aus der OD_{rel} wurde weiter die „Inhibitorische relative Optische Dichte“ ($IHOD_{rel}$) folgendermaßen berechnet:

$$IHOD_{rel} = 100 - OD_{rel}$$

3.3 Western Blot und Immunofärbung

Zum Nachweis von Stx-spezifischen Antikörpern wurden Stx1 und Stx2 mittels Tricine-PAGE aufgetrennt, im Semi-Dry Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend eine Immunofärbung der Proteine durchgeführt.

3.3.1 Tricine-SDS-PAGE

Die Tricine-SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow (240) wurde in vertikalen, jeweils 1 mm dicken 4 %-igen Sammelgelen und 10 %-igen Trenngelen unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde eine Elektrophoresekammer für Proteingele (Fa. Biometra) verwendet. Die zwei Glasscheiben wurden mit den Abstandhaltern in den Gießstand eingespannt, anschließend das Trenngel blasenfrei einpipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisation wurde das Isopropanol abgenommen, die Oberfläche des Trenngels zweimal mit *A. dest.* gespült und das Sammelgel darauf pipettiert. Der Probenkamm wurde zwischen den Scheiben platziert und wiederum 30 min Polymerisationszeit abgewartet. Danach wurden die Gele in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, die Probenkämme entfernt und Kathodenpuffer in die innere Pufferkammer gefüllt. Vor dem Probenauftrag wurden die Proben 1:2 (v:v) mit Tricine-Probenpuffer vermischt, 10 min auf 100 °C erhitzt und dann in die mit Kathodenpuffer gespülten Geltaschen pipettiert (100 µl/3 cm Slot). Nach dem Beladen des Gels wurde die äußere Pufferkammer mit Anodenpuffer gefüllt. Als Molekularmassenstandard wurde „SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Standard“ verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 mA für ca. 2 h über eine effektive Trennstrecke von etwa 5,0 cm. Anschließend wurde das Gel entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel zur Durchführung des Semi-Dry-Westernblot (3.3.3) verwendet. Anschließend wurde es für 30 min in Tricine-Fixierlösung fixiert. Durch 30-minütiges Schwenken in Färbelösung (RT, Wippe) und anschließendem Entfärben in 10 %-iger Essigsäure (50-60 min, RT, Wippe) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Wurde das Trenngel ausschließlich zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine verwendet, erfolgte die Fixierung und Färbung direkt im Anschluss an die Elektrophorese. Zur Haltbarmachung wurden die Tricine-Polyacrylamidgele auf Filterpapier überführt und im Vakuum für 2 h bei 80 °C getrocknet (Geltrockner, Fa. BIO-RAD).

3.3.2 Überprüfung des verwendeten Stx1

Tricine PAGE

Das hochaufgereinigte Stx1 zur Verwendung im Immunoblot wurde von Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des Toxins betrug nach Angaben dieser Arbeitsgruppe 1,9 mg/ml. Zunächst wurde das Toxin in einer log₂-Verdünnungsreihe in 50 mM Tris-Lösung in 5 Stufen ausverdünnt und anschließend in einer Tricine-PAGE aufgetrennt (3.3.1) (10 µl der Toxin/Tris-Verdünnung wurden mit je 10 µl Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert). Der Auftrag der Probe erfolgte auf einen Probenkamm mit 6 mm breiten Probenaschen, wobei 20 µl je Probenasche aufgetragen wurden. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Tricine-Färbelösung gefärbt und anschließend entfärbt. Anhand der sichtbaren Banden wurde eine Beurteilung der Reinheit des Toxins vorgenommen sowie dessen optimale Verdünnung für die weiteren Untersuchungen festgelegt.

Die Überprüfung der Reinheit ergab, dass zwei Proteinbanden auf der Höhe von 34 kiloDalton (kDa) sowie 7 kDa sichtbar waren, welche der A- (34 kDa) und B-(7 kDa) Untereinheit von Stx1 zugeordnet wurden. Die Proteinbanden waren bis zu einer Verdünnung von 1:40 zu erkennen. Das Toxin wurde daraufhin in allen weiteren Versuchen in der höchsten Konzentration (1:10 mit 50 mM Tris-Lösung versetzt) verwendet, um nach dem Western Blot eine ausreichende Menge an Protein auf der Nitrozellulosemembran zu garantieren.

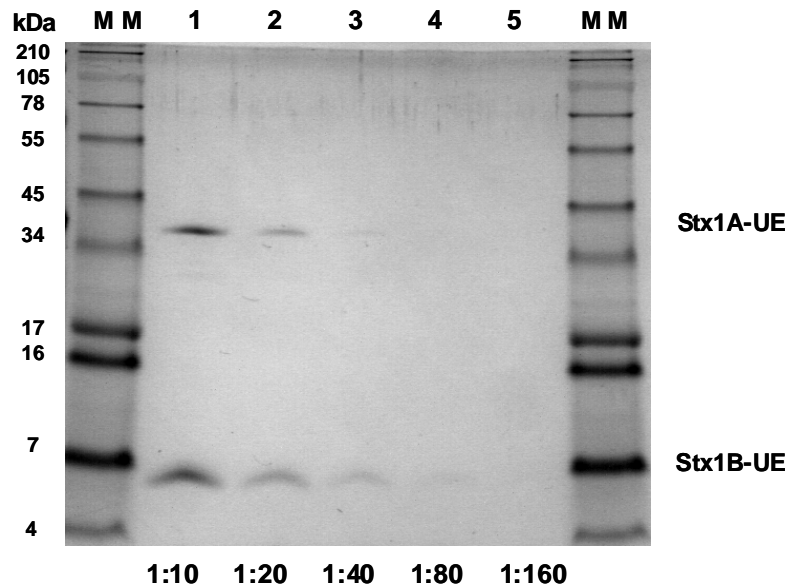


Abb. 3: Tricine-PAGE von Stx1

Tricine-PAGE von Stx1, Proteinbande für die Stx1A- bzw. Stx1B-Untereinheit bis zur Verdünnung 1:40 sichtbar; **Spur 1-5:** log₂-Verdünnung des Toxins in 50 mM Tris-Lösung, Verdünnungsstufen 1:10 bis 1:160; **kDa:** Kilodalton; **MM:** Molekularmassenstandard SeeBlue® Plus 2; **Stx1A-UE:** A-Untereinheit von Stx1; **Stx1B-UE:** B-Untereinheit von Stx1.

Verozelltest

Das verwendete Stx1 wurde im Vero-ZT auf seine Verozell-Zytotoxizität hin überprüft (siehe 3.1.2). Dazu wurde das 1:100 in NaCl-Lösung vorverdünnte Toxin im Dreifachansatz in einer log 10-Verdünnungsreihe in NaCl-Lösung austitriert. Die Positivkontrolle enthielt eine NaCl-Lösung mit 1 % SDS, die Negativkontrolle ausschließlich NaCl-Lösung. In der zweiten Komponente erhielten alle Vertiefungen 50 µl Zellkulturmedium 1, die dritte Komponente bestand für alle Vertiefungen aus der Zellsuspension in Zellkulturmedium 1. Nach Inkubation und Durchführung des MTT-Tests wurde die CD₅₀/ml des Toxins wie beschrieben berechnet. Die Überprüfung des Stx1 im Verozell-Zytotoxizitätstest ergab eine CD₅₀ von 115.671.500/ml Toxin.

3.3.3 Semi-Dry Western Blot

Die mittels Tricine-SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung des Semi-Dry-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden die Graphitanode der Elektrodenblotkammer, die auf die Größe des Gels zugeschnittenen Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in folgender Reihenfolge aufgebaut: sechs in Anodenpuffer 1 und drei in Anodenpuffer 2 getränkte Filterpapiere, die 1 Stunde in *A. dest.* eingeweichte und 10 min

in Anodenpuffer 2 äquiliibrierte Nitrozellulosemembran, das für 10 min in Anodenpuffer 2 äquiliibrierte Tricine-SDS-Gel und schließlich neun in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Nach Auflage der Graphitkathode erfolgte der Transfer ($0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran, RT, ca. 90-100 min). Anschließend wurde die Membran in PBS-Puffer eingelegt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.4 Immunofärbung

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotten je nach Bedarf in 1-2 mm breite Streifen zugeschnitten und für eine Stunde bei RT mit Blockingreagenz (1:10 [v:v] Blockstammlösung in *A. dest.* verdünnt, 20 % ovines Serum). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween (1 ml/1 mm Membranstreifen/Waschung, 5 min, RT) wurde die Membran mit der zu untersuchenden Probe (verdünnt in PBS-Tween) für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgten ein Waschschriff sowie die Zugabe von Sekundärantikörpern (Meerettichperoxidase-markierte Schafantikörper gegen bovines Immunglobulin G₁, G₂ oder A), welche in PBS-Tween verdünnt wurden. Nach einer Stunde bei RT wurde die Membran dreimal mit PBS-Lösung gewaschen (1 ml/1 mm Membran, 5 min/Waschschriff, RT). Daraufhin wurde die Substratlösung (Chloronaphthol-Gebrauchslösung) zugegeben (1 ml/1 mm Membranstreifen, 30 min, Lichtabschluss) und die Enzymreaktion durch zweimaliges Waschen der Membran mit *A. dest.* abgestoppt (1 ml/1 mm Membran, 5 min, RT). Bei jeder Immunofärbung wurde stets ein 1-2 mm breiter Streifen der geblotteten Membran zur Sichtbarmachung der transferierten Proteinbanden mit Amidoschwarz-Färbelösung für 5-10 min unter leichtem Schwenken bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Streifen solange mit *A. dest.* abgespült, bis sich keine Farbreste mehr entfernen ließen. Die Streifen wurden anschließend für 15 min bei RT in einer Fixier-/Entfärbelösung geschwenkt.

Nach der Entwicklung wurde eine visuelle Beurteilung der Bandenstärke für die Stx-A und Stx-B-Untereinheit im feuchten und trockenen Zustand der Membran vorgenommen.

3.3.4.1 Einstellung der Primär- und Sekundärantikörper-Konzentrationen

Zur Abschätzung einer geeigneten Konzentration für Primär- und Sekundärantikörper bei der Durchführung der Immunofärbung wurden zunächst eine Tricine-PAGE und ein Western Blot wie beschrieben durchgeführt. Als Protein diente in diesem Falle jedoch kein aufgereinigtes Stx, sondern ein Polymyxin-Gesamtzelllysat eines isolierten STEC-Stammes. Das Lysat

wurde wie beschrieben aus dem Stamm JF 31-1 hergestellt und im Vero-ZT auf das Vorhandensein von Stx hin überprüft (5.2.5). Anschließend erfolgte die Durchführung der Immunofärbung wie beschrieben. Dazu wurden verschiedene Kälber- und Rinderseren 1:2, 1:10, 1:100 sowie 1:1000 in PBS-Tween-Lösung verdünnt und mit verschiedenen konzentrierten Sekundärantikörperlösungen weiter inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden dabei 1:500, 1:1000, 1:2000 sowie 1:4000 in PBS-Tween-Lösung verdünnt.

Am Ende des Tests wurde die Qualität der Farbreaktion auf Höhe der zahlreichen Proteinbanden miteinander verglichen und das optimale Verdünnungsverhältnis von Serum (Primärantikörper) und Sekundärantikörper bestimmt.

Für den Nachweis Stx1-spezifischer Immunglobuline vom Typ IgG₁ und IgG₂ wurde daraufhin stets mit 1:100 in PBS-Tween verdünntem Serum und 1:500 in PBS-Tween verdünntem Sekundärantikörper gearbeitet. Beim Nachweis von bovinen Immunglobulinen der Klasse IgA wurden die Seren nur 1:10 in PBS-Tween-Lösung verdünnt, die Sekundärantikörperverdünnung betrug ebenfalls 1:500.

4 Nachweis der STEC-Ausscheidung

4.1 Nachweis von Stx-Genen in Kotproben

4.1.1 Probenaufbereitung

Die von den Tieren gewonnenen Kotproben (1.3.4) wurden bis zu ihrer Aufarbeitung bei -70 °C gelagert. Zum Nachweis von Stx-Genen wurden die Kotproben bei RT aufgetaut und mechanisch durchmengt. Dann wurden 0,2 g Kot in 100 µl NaCl-Lösung eingewogen, gut vermischt und die gesamte Lösung gleichmäßig auf eine Gassner-Agar-Platte ausgebracht. Die Platten wurden für 16-18 h bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag mit je 2 ml steriler NaCl-Lösung abgeschwemmt. Dabei wurde möglichst das gesamte Koloniematerial von der Platte abgelöst. 50 µl des abgeschwemmten Materials wurden in 200 µl *A. dest.* verdünnt und für 2 min gekocht. 3 µl dieser Lösung wurden als Ausgangsmaterial in die *stx1/stx2*-Multiplex-PCR eingesetzt.

4.1.2 *stx1/stx2*-Multiplex-PCR

Alle verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Sie wurden mit *A. dest.* auf eine Konzentration von 100 pmol (100 µM) eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils mit den aufgeführten Parametern im Thermocycler 1 (Fa. PERKIN ELMER) durchgeführt. Für die *stx1/stx2*-Multiplex PCR wurden Primer nach Bosworth und Casey (32) sowie nach Franck *et al.* (74) verwendet (Tab. 10). Das Primerpaar nach Bosworth und Casey wurde im Vorfeld von Barth *et al.* auf seine Anwendbarkeit zum Nachweis verschiedener *stx2*-Subtypen überprüft (9). Dabei wurden die *stx2*-Varianten *stx2*, *stx2c*, *stx2vh-a* und *stx2vh-b* (*stx2d* aktivierbar), *stx2-NV206*, *stx2d* (OX-3a, nicht aktivierbar) sowie *stx2e* erkannt. Die Variante *stx2f* wurde dagegen nicht erkannt (9).

Ein Reaktionsansatz (30 µl) enthält 3 µl 10 x NH₄-Mix, 1,2 µl 50 mM MgCl₂, 3 µl Multiprimermix (0,5 µM/Primer), 1 µl Nukleotide (dNTP), 0,2 µl DNA-Polymerase sowie 3 µl der wie beschrieben aufbereiteten Probe. Der Ansatz wurde mit *A. dest.* auf 30 µl aufgefüllt (Tab. 9).

Tab. 9: *stx1/stx2*-Multiplex-PCR, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Reagenz	Menge/Testansatz	Endkonzentration im Testansatz
<i>A. dest.</i>	18,6 µl	-
NH ₄ -Mix (10 x PCR-Puffer)	3 µl	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,2 µl	2 mM
Multiprimermix (5 µM/Primer)	3 µl	0,5 µM/Primer
dNTP (4 mM/Nukleotid)	1 µl	133 µM/Nukleotid
PANScript Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,03 U/µl
Probe	3 µl	-
Volumen/Ansatz	30 µl	

Als Positivkontrolle diente der *E. coli*-Stamm EDL933 (Tab. 13). Von diesem wurde eine für 12 h bei 37 °C in LB-Medium inkubierte Schüttelkultur angelegt, welche anschließend für 2 min bei 100 °C denaturiert und dann in die PCR eingesetzt wurde. *A. dest.* anstatt der Probe diente als Negativkontrolle. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Profil: 5 min Denaturierung bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 30 sek

Denaturierung (94 °C), 30 sek Anlagerung (55 °C) und 1 min Verlängerung (72 °C). Jeder Test wurde mit einer 5-minütigen Inkubation bei 72 °C abgeschlossen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 2 %-igen Agarosegelen in horizontalen Flachbettgelen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Es wurde eine Spannung von ca. 4 V pro cm Elektrodenabstand für 2-3 h angelegt.

Die Gele wurden vor dem Gießen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Der Probenauftrag erfolgte durch Mischen des PCR-Ansatzes mit 3 µl Loading-Puffer. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus mitgeführt (Fa. Fermentas). Die Sichtbarmachung der im elektrischen Feld aufgetrennten DNA-Moleküle erfolgte mit UV-Licht (Bildokumentationssystem E.A.S.Y. 429K, Fa. Herolab).

Tab. 10: Für die *stx1/stx2*-Multiplex PCR verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Gen	Amplikon (bp)	Position	Datenbank-Eintrag-Nr.
Stx1-1	TTCGCTCTGCAATAGGTA	<i>stxA1</i>	533	280-297	Z36899
Stx1-2	TTCCCCAGTTCAAGTTAAGAT	<i>stxB1</i>		<u>814-834</u>	
Stx2e-1	AATAGTATACGGACAGCGAT	<i>stxA2e</i>	733	1072-1091	M21534
Stx2e-2	TCTGACATTCTGGTTGACTC	<i>stxB2e</i>		<u>359-378</u>	

Erläuterungen: Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der Datenbank EMBL/GenBank; die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen.

4.1.3 Bestimmung der Nachweisgrenze für die *stx1/stx2*-Multiplex-PCR

Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgte anhand verschiedener Kotproben, die im Vorfeld in den oben beschriebenen PCRs negativ auf das Vorhandensein von Stx-Genen getestet wurden. Sie wurden mit definierten Mengen eines Testkeims versetzt bevor die *stx1/stx2*-Multiplex-PCR wie erläutert durchgeführt wurde.

Als Testkeim wurde der *E. coli*-Stamm EDL933 (Tab. 13) herangezogen. Dazu wurde am Vortag eine Flüssigkultur des Keimes in LB-Medium angelegt und bei 37 °C und 180 U/min für 18 h inkubiert. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte der Keimsuspension bei 600 nm photometrisch bestimmt (Beckman DU-640). Der Testkeimgehalt der Suspension (KbE/ml) wurde anschließend wie bei Barth beschrieben (8) mit der Formel:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = \text{OD}_{600\text{nm}} \times 10^9$$

bestimmt. Ausgehend von dem errechneten Keimgehalt wurden Bakteriensuspensionen (in NaCl-Lösung) mit verschiedenen Testkeimgehalten hergestellt und mit 0,2 g der jeweiligen Kotprobe vermischt, so dass verschiedene Aliquots einer Kotprobe mit 10^{-1} bis 10^8 Koloniebildenden Einheiten (KbE) Testkeim/g Kot vorlagen. Außerdem wurde die gleiche Menge Kotprobenaliquots ohne Zugabe der Testkeimsuspensionen angezüchtet. Hier wurde erst dem abgeschwemmten Koloniematerial die entsprechende Testkeimmenge zugeführt und dann weiter verfahren. Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgte nach Gelelektrophorese und Sichtbarmachung der Bande und wurde entsprechend der Keimzahl des Kotprobenaliquots (KbE/g Kot) festgelegt, bei der die PCR-Untersuchung eine gerade noch deutliche Bande im Elektropherogramm lieferte.

Die beschriebenen Untersuchungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR wurden insgesamt 3 mal durchgeführt, wobei jeweils unterschiedliche, zuvor negativ auf das Vorhandensein von Stx-Genen getestete Kälberkotproben verwendet wurden. In den Untersuchungen konnte zweimal eine Nachweisgrenze von 10^2 KbE/g Kot, in einem Fall eine Nachweisgrenze von 1×10^1 KbE/g Kot (Abb. 4) ermittelt werden. Bei einer weiteren Untersuchung wurden außerdem einige Kotprobenaliquots erst nach dem Abschwemmen von der Gassner-Agar-Platte mit den entsprechenden Testkeimsuspensionen versetzt, um zu überprüfen, ob sich die Anzucht- und Abschwemmungsmethode auf die Nachweisgrenze auswirkt. Die Untersuchung ergab auch in diesem Fall eine Nachweisgrenze von 1×10^2 KbE/g Kot.

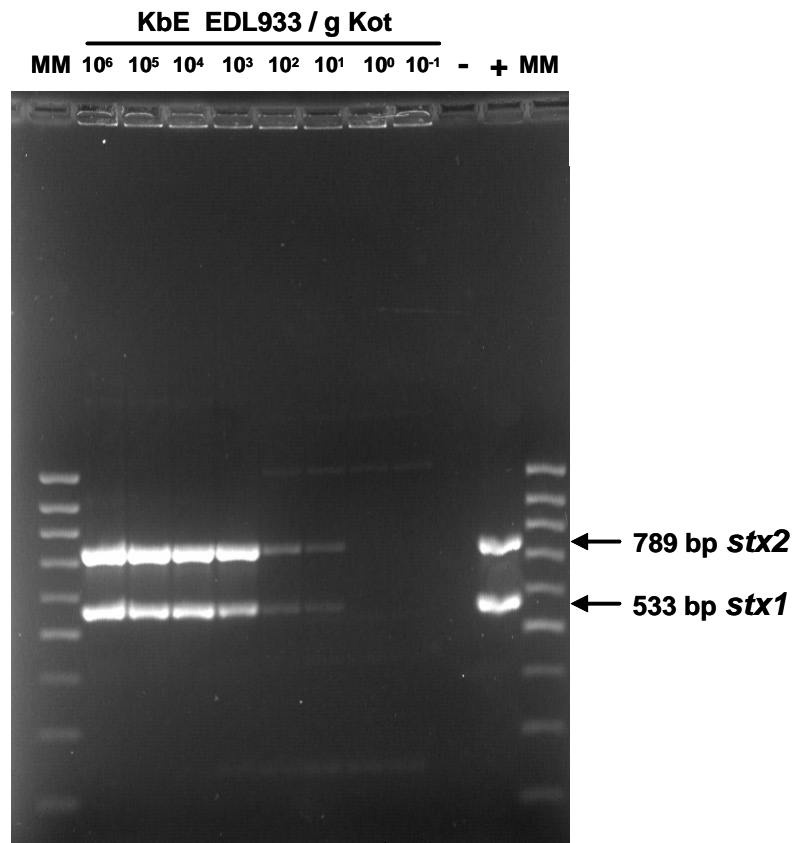


Abb. 4: Nachweisgrenze der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR

Elektropherogramm eines 2 %-igen Agarosegels nach Ethidiumbromidfärbung; **bp**: Basenpaare; **MM**: Molekularmassenstandard Gene Ruler™ 100 bp; **10⁶ bis 10⁻¹**: Kotprobe war mit 10⁶-10⁻¹ KbE EDL933/g Kot versetzt; **+**: Positivkontrolle *E. coli* –Stamm EDL933; **-**: Negativkontrolle *A. dest.*.

Zur Klärung der Frage, ob und wenn ja in welchem Umfang Stx-Genfragmente inaktiver Keime einen positiven Befund in der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR liefern, wurden ebenfalls *stx*-negative Kotproben in 2 mal 10 Portionen à 0,2 g geteilt und mit verschiedenen konzentrierten Testkeimsuspensionen (EDL933, 10⁻¹ bis 10⁸ KbE/g Kot) versetzt. 10 Kotproben mit Testkeimverdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁸ KbE/g Kot wurden jedoch vor dem Ausbringen auf die Gassner-Agar-Platten für 2 min bei 100 °C gekocht, so dass enthaltene Testkeime inaktiviert wurden. Die restlichen 10 Proben wurden wie beschrieben angezüchtet. Die weiteren Schritte und die Durchführung der PCR erfolgten entsprechend. Es zeigte sich, dass Stx-Gene inaktivierter Keime erst dann mit der PCR nachgewiesen werden konnten, wenn eine Ausgangsmenge des Testkeimes in den Kotproben von mindestens 10⁶ KbE/g Kot vorlag (Abb. 5, A). Dagegen wurden Stx-Gene nicht inaktivierter Keime bis zu einem Gehalt von 10¹ KbE/g Kot nachgewiesen.

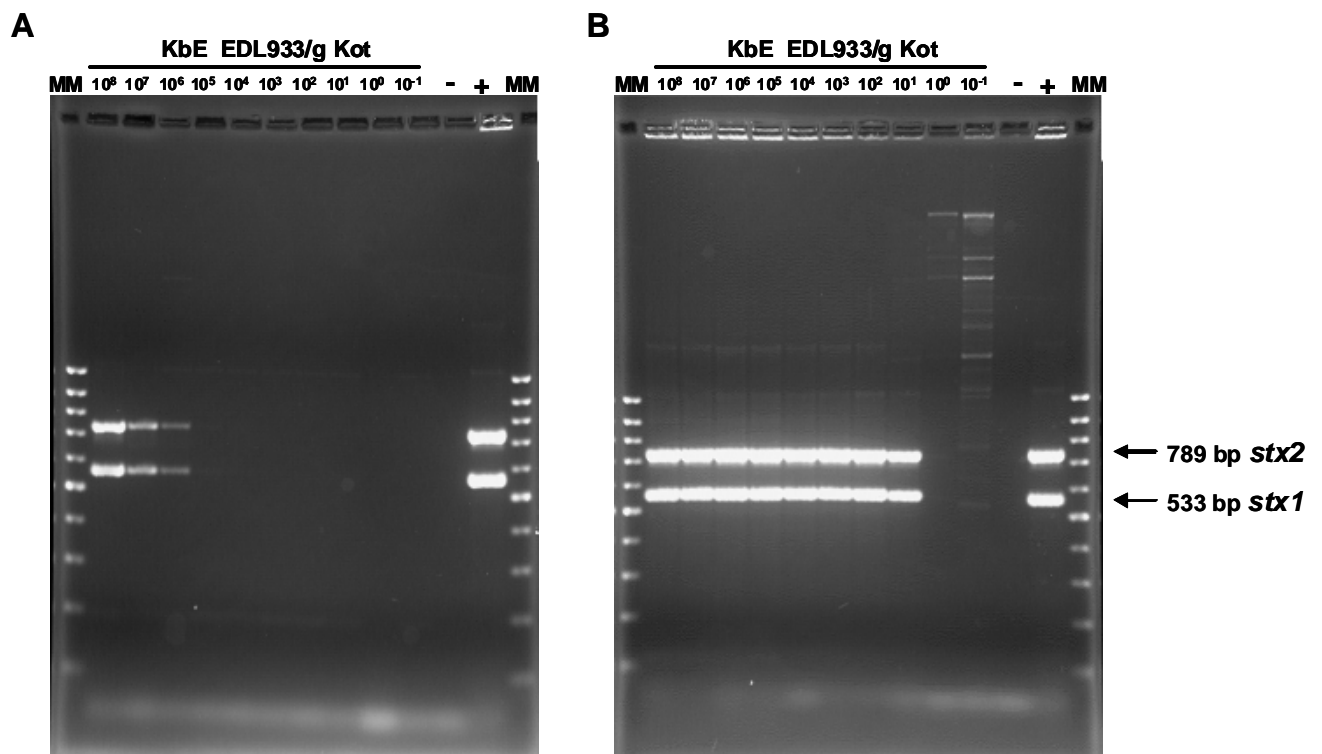


Abb. 5: *stx1/stx2*-Multiplex-PCR, Nachweis von DNS inaktivierter Keime

Elektropherogramm eines 2 %-igen Agarosegels nach Ethidiumbromidfärbung; Testkeime vor der Anzucht auf Gassner Agar durch Kochen inaktiviert (A) bzw. Anzucht der mit Testkeimen versetzten Kotproben ohne Inaktivierung der Bakterien (B); **bp**: Basenpaare; **MM**: Molekularmassenstandard Gene Ruler™ 100 bp; **10⁸ bis 10⁻¹**: KbE EDL933/g Kot im Ansatz; **+**: Positivkontrolle *E. coli*-Stamm EDL933; **-**: Negativkontrolle *A. dest.*

4.1.4 *stx2*-Typisierungs-PCRs

Alle Kotproben, bei denen die *stx1/stx2*-Multiplex-PCR einen positiven Befund für das Vorliegen von Stx2-Genen ergab, wurden in fünf verschiedenen PCR-Reaktionen (*stx2*-, *stx2c*-, *stx2d*-, *stx2f*-, *stx2e*-PCR) nach Nakao *et al.* (176) untersucht, um den *stx2*-Subtyp der entsprechenden Probe zu bestimmen. Es wurden dazu die für die *stx1/stx2*-Multiplex-PCR aufgearbeiteten Proben verwendet. Alle verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (Tab. 12) wurden bei der Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Sie wurden mit *A. dest.* auf eine Konzentration von 100 pmol (100 µM) eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils mit den aufgeführten Parametern im Thermocycler 1 durchgeführt. Der Reaktionsansatz der PCR entsprach in seiner Zusammensetzung dem der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR (Tab. 11).

Tab. 11: *stx2*-Typisierungs-PCRs, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Reagenz	Menge/Testansatz	Endkonzentration im Testansatz
<i>A. dest.</i>	20,1 µl	-
NH ₄ -Mix (10 x PCR-Puffer)	3 µl	1 x
MgCl ₂ (50mM)	1,2 µl	2 mM
Entsprechendes Primerpaar (5 µM/Primer)	je 0,75 µl	0,5 µM/Primer
dNTP (4 mM/Nukleotid)	1 µl	133 µM/Nukleotid
PANScript Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,03 U/µl
Probe	3 µl	-
Volumen/Ansatz	30 µl	

Als Positivkontrolle dienten die *E. coli*-Stämme EDL933 (*stx2*), E32511 (*stx2c*), EH250 (x506/02) (*stx2d*), 412 (*stx2e*) und BgVV97/00 (*stx2f*) (Tab. 13). Als Negativkontrolle wurde *A. dest.* eingesetzt. Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte nach folgendem Protokoll: 5 min Denaturierung bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung (94 °C), 30 sek Anlagerung (Temperatur PCR-spezifisch) und 1 min Verlängerung (72 °C). Jeder Test wurde mit einer 5-minütigen Inkubation bei 72 °C abgeschlossen. Die Anlagerungstemperatur betrug für die *stx2*-und *stx2d*-PCR 65 °C, für die *stx2c*-PCR 69 °C, für die *stx2f*-PCR 61 °C sowie 55 °C für die *stx2e*-PCR. Die Auftrennung und Sichtbarmachung der Fragmente erfolgte wie für die *stx1/stx2*-Multiplex PCR beschrieben in 1,5 %-igen Agarosegelen.

Tab. 12: *stx2*-Typisierungs-PCRs, verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Gen	Amplikon (bp)	Position	Datenbank-Eintrag-Nr.
Stx2-F	AGATATCGACCCCTCTTGAA	<i>stxA2</i>	967	372-391	X07865
Stx2-R	GTCAACCTTCACTGTAAATG	<i>stxB2</i>		<u>1319-1338</u>	
Stx2-G1-F	TACGATGACGCCGGGAGAC	<i>stxA2c</i>	468	829-847	M59432
Stx2-G1-R	GGCCACTTTTACTGTGAATGTA	<i>stxB2c</i>		<u>1275-1296</u>	
Stx2-G2-F	TATACGATGACACCGGAAGAAG	<i>stxA2d</i>	300	807-828	AF043627
Stx2-G2-R	CCTGCGATTTCAGAAAAGCAGC	<i>stxA2d</i>		<u>1086-1106</u>	
Stx2-G3-F	TTTACTGTGGATTCTCTTCGC	<i>stxA2f</i>	875	326-347	M29153
Stx2-G3-R	TCAGTAAGATCCTGAGGCTTG	<i>stxA2f</i>		<u>1180-1200</u>	
Stx2-G4-F	CAGGAAGTTATATTCCGTAGG	<i>stxA2e</i>	911	406-427	M36727
Stx2-G4-R	GTATTCTCTCCTGACACCTTC	<i>stxB2e</i>		<u>1295-1316</u>	

Erläuterungen: Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der Datenbank EMBL/GenBank; die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen.

Tab. 13 gibt einen Überblick über die in der *stx1/stx2*-Multiplex PCR und in den *stx2*-Typisierungs-PCRs verwendeten *E. coli*-Kontrollstämme:

Tab. 13: *E. coli*-Kontrollstämme

Stamm	Serovar	Virulenzgene,	Herkunft	Referenz
EDL 933	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae, ehxA</i>	Mensch	A
E32511	O157:H-	<i>stx2, stx2c, eae</i>	Mensch	B
EH250	O118:H12	<i>stx2d</i>	Mensch	B
412	O139:K82	<i>stx2e</i>	Schwein	B
BgVV97/00	k.A.	<i>stx2f</i>	Taube	C

Erläuterungen: **A:** American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA, #700927D; **B:** Dr. K. Ziebell, Guelph, Kanada; **C:** Prof. Dr. Karch über Dr. habil. P. Gallien, BfR Dessau; **k.A.:** keine Angaben.

4.1.5 Bestimmung der Nachweisgrenze für die *stx2/stx2c*-Typisierungs-PCR

Hierbei wurde genauso verfahren, wie für die Bestimmung der Nachweisgrenze der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR beschrieben. Als Testkeime wurden die *E. coli*-Stämme EDL933 (für *stx2*, Tab. 13) sowie E32511/HSC (x-673/05) (für *stx2c*, Tab. 7) verwendet. Hier wurden die Kotproben ausschließlich direkt mit der Testkeimsuspension versetzt. Die Auswertung erfolgte wie beschrieben.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze der *stx2*-Typisierungs-PCRs wurden für die *stx2*- und *stx2c*-PCR jeweils 1-mal durchgeführt. Für die *stx2*-PCR wurde eine Nachweisgrenze von 1×10^0 KbE/g Kot, für die *stx2c*-PCR von 1×10^1 KbE/g Kot ermittelt (Abb. 6).

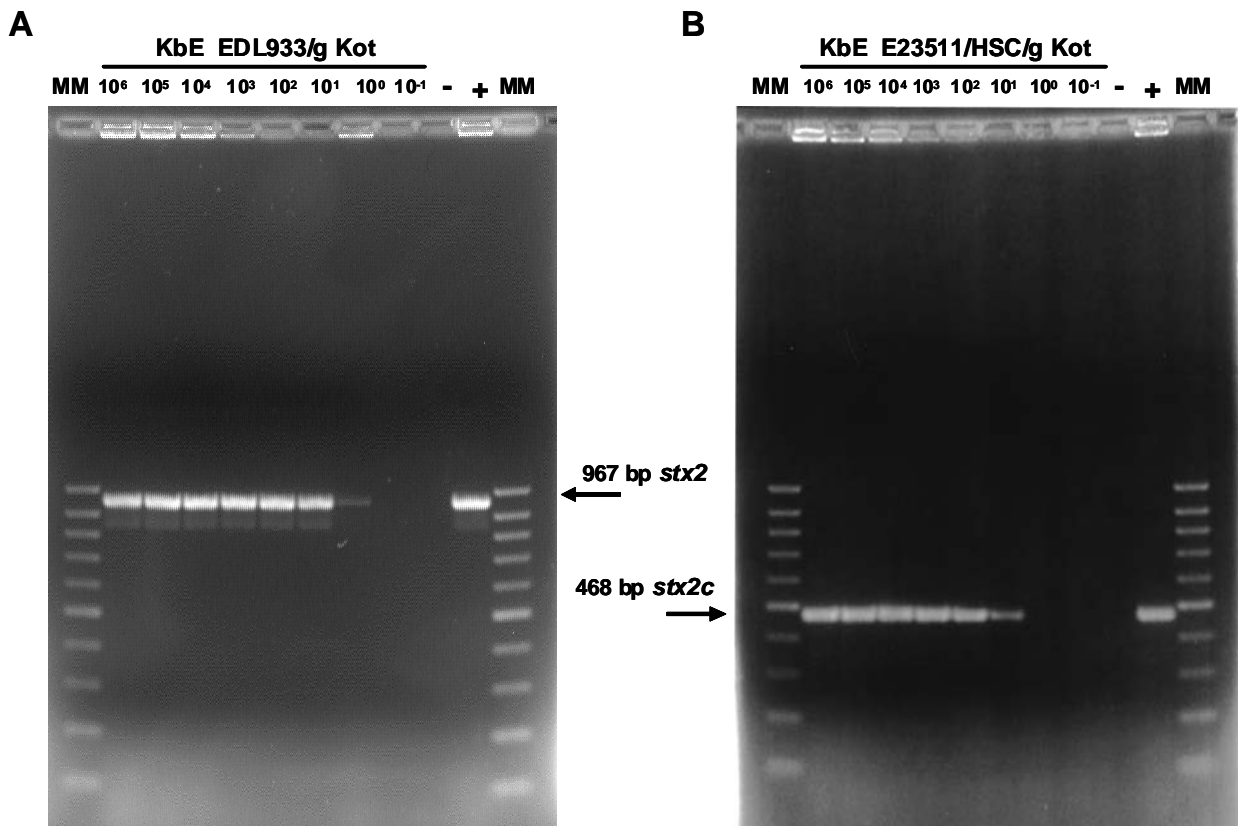


Abb. 6: Nachweisgrenze der *stx2*-Typisierungs-PCRs

Elektropherogramm eines 2 %-igen Agarosegels nach Ethidiumbromidfärbung; *stx2*-PCR (A): 10⁶ bis 10⁻¹: KbE EDL933/g Kot im Ansatz; +: Positivkontrolle *E. coli*-Stamm EDL933; -: Negativkontrolle *A. dest.*; *stx2c*-PCR (B); 10⁶ bis 10⁻¹: KbE E23511/HSC/g Kot im Ansatz; +: Positivkontrolle *E. coli*-Stamm E23511/HSC; -: Negativkontrolle *A. dest.*; **bp**: Basenpaare; **MM**: Molekularmassenstandard Gene Ruler™ 100 bp.

4.2 Nachweis von Stx im Kot

Zum direkten Nachweis von Stx in Kotproben wurde der bereits beschriebene kommerzielle Novitec® Verotoxin Test verwendet (3.2.1). Bei der Aufarbeitung der Kotproben wurde den Herstellerangaben zur Durchführung des Tests mit frischen oder gefrorenen humanen Kotproben gefolgt. Dazu wurde ca. 1 g einer Kotprobe mit 4 ml Waschpuffer-Gebrauchslösung versetzt und für mehrere Minuten durchgemengt, bis eine einheitliche Kotsuspension vorlag. 100 µl der Suspension wurde in die Mikrotiterkavitäten eingesetzt. Dann wurde der Test nach den Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet.

5 Isolierung und Charakterisierung von STEC-Stämmen

5.1 Anzuchtverfahren

Zur Isolation von bovinen STEC wurden Kotproben, die zuvor positiv auf das Vorhandensein von *Stx*-Genen getestet worden waren, in NaCl-Lösung (0,2 g Kot/100 µl NaCl-Lösung) verdünnt, nach Durchmischung auf Gassner-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C für 18 h angezüchtet. Am folgenden Tag wurden von jeder Platte etwa zehn laktosepositive Kolonien abgenommen, in LB-Medium überführt und für weitere 12-18 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Diese Übernachtskulturen dienten zur Weiterkultivierung der Stämme sowie nach Inaktivierung (2 min, 100 °C) als Probenmaterial für verschiedene PCR-Reaktionen.

5.2 Typisierung der STEC

5.2.1 *stx1/stx2*-Multiplex-PCR und *stx2*-Typisierungs-PCRs

Zunächst wurden alle Isolate auf das Vorhandensein von *Stx1/Stx2*-Genen überprüft. Dabei wurden die inaktivierten Übernachtskulturen in die *stx1/stx2*-Multiplex-PCR eingesetzt (4.1.2) und die *stx2*-Typen gegebenenfalls in den *stx2*-Typisierungs-PCRs (4.1.4) wie beschrieben untersucht.

5.2.2 Multiplex-PCR für *stx*, *ehxA*, *eae*

Um die *stx*-positiven Isolate auf das Vorliegen weiterer STEC-Virulenzfaktoren zu überprüfen, wurde eine weitere Multiplex-PCR durchgeführt. Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (Tab. 15) wurden bei der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellt und vor ihrem Gebrauch auf eine Konzentration von 100 pmol (100 µM) eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils mit den aufgeführten Parametern im Thermocycler 5 (Fa. Biometra) durchgeführt (Tab. 14).

Tab. 14: Multiplex-PCR für *stx*, *ehxA*, *eae*; Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Reagenz	Menge/Testansatz	Endkonzentration im Testansatz
<i>A. dest.</i>	18,6 µl	-
NH ₄ -Mix (10 x PCR-Puffer)	3 µl	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,2 µl	2 mM
Multiprimermix (2,5 bzw. 5 µM/Primer ¹⁾)	3 µl	0,25/0,5 µM/Primer
dNTP (4 mM/Nukleotid)	1 µl	133 µM/Nukleotid
PANScript Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,03 U/µl
Probe	3 µl	-
Volumen/Ansatz	30 µl	

Erläuterungen: 1): Konzentration im Multiprimermix.

Als Positivkontrolle diente der *E. coli*-Stamm EDL933 (Tab. 13), als Negativkontrolle wurde *A. dest.* eingesetzt. Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte nach folgendem Protokoll: 5 min Denaturierung bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung (94 °C), 30 sek Anlagerung (57 °C) und 1,5 min Verlängerung (72 °C). Jeder Test wurde mit einer 5-minütigen Inkubation bei 72 °C abgeschlossen. Die Auftrennung und Sichtbarmachung der Fragmente erfolgte wie bereits beschrieben in 2 %-igen Agarosegelen.

Tab. 15: Multiplex-PCR für *stx*, *ehx*, *eae*; verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Gen	Amplikon (bp)	Position	Datenbank-Eintrag-Nr.
F-EaeA-1	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	<i>eaeA</i>	425	1060-1484	Z11451
F-EaeA-2	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA			1463-1484	Z11452
VT2_for	ACCGTTTTTCAGATTTTACACATA	<i>stx2</i>	298	377-400	AY143337
VT2_rev	TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT			651-674	
VT1_for	GGAGAGTCCGTGGGATTACG	<i>stx1</i>	130	1547-1566	AF461172
VT1_rev	AGCGATGCAGCTATTAATAA			1658-1676	
ehxA-F	GCATGATGAAGCGTACGTTCC	<i>ehxA</i>	533	70-90	X79839
ehxA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			<u>581-602</u>	

Erläuterungen: Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der Datenbank EMBL/GenBank; die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen.

Aus den angegebenen Oligodesoxyribonukleotiden wurde der Multiprimermix folgendermaßen hergestellt (Tab. 16):

Tab. 16: Multiplex-PCR für *stx*, *ehx*, *eae*; Zusammensetzung des Multiprimermix

Primer	Referenz	Stamm-Konz.	Menge	Konz. im Multiprimermix
F-EaeA-1	(74)	100 µM (100 pM/µl)	25 µl	2,5 µM
F-EaeA-2	(74)	"	25 µl	2,5 µM
VT2_for	(183)	"	25 µl	2,5 µM
VT2_rev	(183)	"	25 µl	2,5 µM
VT1_for	(183)	"	50 µl	5 µM
VT1_rev	(183)	"	50 µl	5 µM
ehxA-F	(207)	"	50 µl	5 µM
ehxA-R	(207)	"	50 µl	5 µM
<i>A. dest</i>		-	ad 1000 µl	-

Erläuterungen: Konz.: Konzentration

5.2.3 Intimin-Typisierungs-PCR

Einige STEC-Isolate wurden hinsichtlich ihres *eae*-Subtyps genauer untersucht. Die Untersuchung erfolgte durch Herrn Dr. Amir Abdulmawjood am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der JLU Giessen (246).

5.2.4 Wachstum auf Selektivagar

Die Isolate wurden auf SMAC-Agar (Sorbitol MacConkey-Agar, Fa. Oxoid) sowie mit Cefexime-Tellurit-Zusatz (Fa. Oxoid) versetztem SMAC-Agar (CT-SMAC)-Platten subkultiviert, bei 37 °C 16-18 h inkubiert und anschließend die Koloniemorphologie sowie das Wachstum bewertet. Bei SMAC-Agar Platten wurde zur Bewertung die Farbe der gewachsenen Kolonien bestimmt. Sorbitol-fermentierende (Sorbitol+) *E. coli* bilden rosafarbene Kolonien, wohingegen Stämme, welche Sorbitol nicht umsetzen können (Sorbitol-), in Form von farblosen Kolonien wachsen. Bei CT-SMAC-Agar-Platten wurde beurteilt, ob die Isolate in ihrem Wachstum gehemmt werden oder nicht.

5.2.5 Überprüfung der *in vitro*-Stx-Bildung

Von den isolierten STEC-Stämmen wurden Polymyxin B-Gesamtzell-Lysate hergestellt. Dazu wurden einige Kolonien der entsprechenden Stämme von Blut-Agar-Platten in 20 ml

LB-Medium überimpft und in 50 ml-Plastikgefäßen (Fa. Greiner Bio-One) für 18 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend zentrifugiert (30 min, 3290 x g, 4 °C, Zentrifuge Eppendorf 5804R), der Überstand verworfen und das Pellet in 1,8 ml Polymyxin B-Lösung (1 mg/ml in NaCl-Lösung, Fa. Pfizer) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend für 45 min bei 37 °C schüttelinkubiert (180 U/min). Anschließend wurde der Zentrifugationsschritt (s.o.) wiederholt, der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein 2 ml Plastik-Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 13000 U/min, RT, Tischzentrifuge Fa. Hettich). Anschließend wurde nochmals der Überstand vorsichtig abpipettiert und aliquotiert. Die Lysate wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

Zur Überprüfung der *in vitro* Stx-Bildungsfähigkeit der STEC-Isolate wurden die hergestellten Polymyxin B-Lysate im Vero-ZT untersucht. Sie wurden hierzu in der ersten Komponente des Testes im Einfachansatz in einer log₁₀-Verdünnungsreihe 3-stufig in NaCl-Lösung austitriert (Endverdünnungen / Vertiefung 1:30 bis 1:3000). Als Positivkontrolle diente 1 %-ige SDS-Lösung, in der Negativkontrolle wurde ausschließlich NaCl-Lösung verwendet. In der zweiten Komponente des Testes wurden je Vertiefung 50 µl Zellkulturmedium 1 zugegeben, die dritte Komponente bestand aus der Verozellsuspension in Zellkulturmedium 1.

Zur Auswertung wurde nach Durchführung des MTT-Tests die relative Zellaktivität (OD_{rel}) der Ansätze mit verschiedenen Lysatverdünnungen berechnet.

Die *in vitro* Stx-Bildung wurde dann als positiv bewertet, wenn die relative Zellaktivität in der ersten Verdünnungsstufe unter 50 % lag.

5.2.6 Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)

Bei der Durchführung wurde die Methode nach Liebisch und Schwarz (142) angewandt:

Die zu untersuchenden Stämme wurden durch Beimpfen von jeweils 2 ml LB-Medium 12-14 h bei 37 °C und 180 U/min im Schüttelinkubator angezüchtet.

Die optische Dichte (OD) der Übernachtskultur wurde durch Verdünnen mit LB-Medium auf eine OD von 0,3 in 5 ml LB-Medium eingestellt. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend für 10 min bei 9000 U/min und RT zentrifugiert (Tischzentrifuge, Fa. Hettich). Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Pellet sofort in 1 ml eiskaltem PETT IV-Puffer resuspendiert. Nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes

wurde das Pellet nach erneutem Absaugen des Überstandes in 2 ml eiskaltem PETT-IV-Puffer resuspendiert und zunächst auf Eis gekühlt.

Zum Gießen der Agaroseblöckchen wurde eine mit TE-Puffer hergestellte 2 %-ige Incert-Agarose-Lösung verwendet, welche nach dem Aufkochen bis zur weiteren Verwendung in einem 56 °C warmen Wasserbad flüssig gehalten wurde. 500 µl der Bakteriensuspension und 500 µl der flüssigen Agarose wurden vermengt und je 100 µl der Mischung umgehend in die Gießförmchen (Plug Molds) gefüllt. Die Förmchen wurden zum Abkühlen für 10 min auf Eis gelagert.

Die erstarrten Agaroseblöckchen wurden anschließend in ein Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel (Fa. Greiner Bio-One) überführt und mit 3 ml Lysepuffer für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Lysepuffer vorsichtig abpipettiert und 3 ml ES-Puffer zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde die Proteinase K-Lösung zugegeben (Endkonzentration 0,65 mg/ml, = ESP-Puffer) und über Nacht bei 56 °C im Brutschrank inkubiert.

Nachdem der ESP-Puffer abpipettiert wurde, erfolgte die Zugabe von 2 ml TE-Puffer sowie 30 µl PMSF-Stammlösung (100 mM, Gebrauchslösung 1,5 mM) für 1 Stunde bei 50 °C im Wasserbad. Anschließend wurden TE und PMSF vorsichtig abgenommen und erneut 2 ml TE-Puffer sowie 30 µl PMSF-Lösung zugegeben. Der Inkubationsschritt wurde wiederholt und die Lösungen erneut abpipettiert. Danach erfolgten die Zugabe von 5 ml TE-Puffer, eine 30-minütige Inkubation bei RT und abschließend das Entfernen des Puffers. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die Blöckchen wurden bis zum Verdau in 2 ml autoklaviertem TE-Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

Je ein Blöckchen wurde in ein 15 ml PS-Plastikgefäß (Fa. Greiner Bio-One) überführt und zur Äquilibrierung mit 400 µl 1 x *Xba*I-Puffer (Buffer Y⁺/Tango™) für 30-60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und durch 400 µl 1 x *Xba*I-Puffer +*Xba*I (20 U) ersetzt. Es folgte die Inkubation des Verdau für 14-16 h bei 37 °C im Brutschrank.

Die Enzym-Puffer-Lösung wurde vorsichtig abgenommen und die verdauten Blöckchen bis zur Elektrophorese in autoklaviertem TE-Puffer gelagert.

Zur Durchführung der Contour clamped homogeneous electric field (CHEF)-Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurden 120 ml einer 1 %-igen Agarose (Pulsed Field Certified Agarose, Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH; in 0,5 x TBE-Puffer) hergestellt. 2 ml der noch

flüssigen Agarose wurden abgenommen und im Wasserbad bei 50 °C flüssig gehalten. Die restliche Agarose wurde zum Gießen eines horizontalen Gels mit 15 Probestaschen à 1,5 mm Breite verwendet, welches für 60 min bei RT aushärtete.

Die PFGE-Kammer wurde mit 1,88 Liter 0,5 x TBE-Puffer befüllt und auf 14 °C vorgekühlt. Zum Laden der Proben wurden von den Blöckchen zunächst 3-4 mm lange Stücke abgeschnitten. Diese wurden vorsichtig und ohne Luftpinschlüsse an die Vorderwand der Probestaschen verbracht. Außerdem wurden 1 mm breite Stücke eines Molekülgrößenstandards (Lambda Ladder PFG Marker, Fa. NEB) in gleicher Weise in die Probestaschen eingesetzt. Anschließend wurden alle Probestaschen mit der flüssig gehaltenen Agarose verschlossen. Nach etwa 15-minütigem Aushärten der Probestaschen erfolgte die Überführung des Gels in die vorgekühlte PFGE-Kammer. Die Elektrophorese wurde anschließend unter folgenden Laufbedingungen im CHEF-Mapper (Fa. Bio-Rad) durchgeführt:

Tab. 17: CHEF-PFGE; Laufbedingungen

Parameter	Laufbedingung
Laufzeit	26:56 h
Spannung	6 V/cm
Winkel elektrisches Feld	120°
Pulszeiten	2,98 sek → 35,38 sek, linear
Temperatur	14 °C
Laufpuffer	0,5 x TBE-Puffer

Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (4 mg/Liter) bei RT unter ständigem Wippen gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung für 60-90 min mit insgesamt 2 Liter autoklaviertem A. *dest.* bei RT auf einer Wippe.

Die Makrorestriktionsmuster der Stämme wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K, Fa. Herolab). Die Auswertung der Muster erfolgte visuell durch Vergleichen der Makrorestriktionsmuster der unterschiedlichen Stämme.

Bei jeder Elektrophorese wurde der Kontrollstamm EDL 933 (Tab. 13), von dem je zwei DNA-Proben auf jedem Gel angeordnet wurden, mitgeführt. Die Anzucht dieses Stammes sowie die Aufbereitung der DNA bis zur Elektrophorese erfolgte wie beschrieben.

Konnte aufgrund von Autodigestion der DNA während der Elektrophorese kein Makrorestriktionsmuster des entsprechenden Stammes erstellt werden, wurden die Laufbedingungen der Elektrophorese modifiziert und die PFGE für die entsprechenden Stämme wiederholt. Dabei wurde der Laufpuffer (0,5 x TBE) mit 100 µM Thioharnstoff (Fa. Fluka) versetzt. Alle weiteren Schritte wurden wie beschrieben durchgeführt.

5.3 Bindungsversuche im Zellkulturmodell (Adhäsionstests)

5.3.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

Zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit im Zellkulturmodell sowie zur Überprüfung der Stx-Bildung während der Adhäsion, wurden folgende bovine STEC-Isolate und *E. coli*-Referenzstämme herangezogen (Tab. 18):

Tab. 18: Zur Durchführung von Adhäsionstests verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Pathovar	Serovar	Virulenzgene	Herkunft	Referenz
E2348/69	EPEC	O127:H6	<i>eae, espB, bfpA</i>	Mensch	A; (141)
EDL 933	EHEC	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae, ehxA</i>	Mensch	B; (191)
JF 31-1	STEC	n.u.	<i>stx1, stx2, eae, ehxA</i>	Kalb	C
JF 29-1	STEC	n.u.	<i>stx1, eae, ehxA</i>	Kalb	C
JF 50-3	STEC	n.u.	<i>stx2, stx2c, eae, ehxA</i>	Kalb	C
JF 9-9	STEC	n.u.	<i>stx1, eae, ehxA</i>	Kalb	C
JF 51-5	STEC	n.u.	<i>stx1, eae, ehxA</i>	Kalb	C
JF 4-5	STEC	n.u.	<i>stx2c</i>	Kalb	C
JF 32-7	STEC	n.u.	<i>stx2c</i>	Kalb	C
C600	K12	K12	-	k.A.	D; (140)

Erläuterungen: **A:** Dr. S. Scotland, Central Public Health Laboratory, London; **B:** American Type Culture Collection, Rockville, USA, #700927D; **C:** diese Arbeit, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen; **D:** Prof. Dr. Helge Karch über Dr. habil P. Gallien, BfR Dessau; **k.A.:** keine Angaben; **n.u.:** nicht untersucht.

5.3.2 Anzucht der Bakterien

Am Tag vor Testbeginn wurden die verwendeten *E. coli*-Stämme über Nacht bei 37 °C ohne Schütteln in LB-Medium angezüchtet. Am Tag des Testes wurde der Bodensatz aufgeschüttelt und die Bakterien auf diese Weise in Suspension gebracht.

Bei Adhäsionsversuchen mit bovinen Kolonkryptenzellen erfolgte die Anzucht der Stämme am Tag vor Testbeginn zunächst unter gleichen Bedingungen, jedoch schüttelnd bei 180 U/min. Am folgenden Tag wurde eine Menge von 150 µl der Schüttelkultur auf 3,0 ml des Zellkulturmediums C aufgefüllt und für 2 Stunden bei 37 °C und 180 U/min präinkubiert, um eine verbesserte Expression von Adhäsionsproteinen zu erreichen. Anschließend wurden 500 µl der Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) überführt und für 8 min bei 8000 U/min und RT abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Fa. Hettich). Das Pellet wurde in 1000 µl NaCl-Lösung resuspendiert und die OD der Suspension bei 600 nm gegen NaCl-Lösung als Leerwert photometrisch bestimmt (Photometer DU® 640, Fa. Beckmann Instruments). Nach erneutem Zentrifugieren wurde die Ziel-OD (ca. 0,6) mit Zellkulturmedium C eingestellt.

5.3.3 Fluorescence Actin Staining-Test (FAS-Test)

Der Nachweis von Aktinkumulationen unter einer bakteriellen Anheftungsstelle erfolgte im FAS-Test modifiziert nach der Methode von Knutton *et al.* (127). Für den Test wurde die entsprechend verwendete Zelllinie wie beschrieben kultiviert. Bei HEp2-Zellen erfolgte 4 Tage vor Testbeginn die Aussaat von je 5×10^4 oder 1×10^5 Zellen/well in 12-Well-Zellkulturplatten (Fa. Corning Costar), so dass bei Testbeginn ein subkonfluent Monolayer ausgebildet war. Die Kultivierung erfolgte mit Zellkulturmedium 1 (1 ml/well) bei 37 °C, 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung. Bei bovinen Kolonkryptenzellen erfolgte die Aussaat von 300 bis 400 Krypten pro cm² in eine 12-Well-Zellkulturplatte (Fa. Corning Costar) am Tag der Kryptengewinnung, ebenfalls vier Tage vor Testbeginn. Diese Zellen erhielten je 800 µl Zellkulturmedium A (Tag 0) / Zellkulturmedium B (Tag 1) und wurden bei 37 °C, 8 % CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert. Am Tag vor Testbeginn erfolgte ein Mediumwechsel in allen Vertiefungen, wobei das verwendete Medium im Falle von HEp2-Zellen dem Zellkulturmedium 1 entsprach, welches jedoch mit 1 % D(+)-Mannose versetzt wurde und frei von Penicillin/Streptomycin war (= Zellkulturmedium 3). Im Falle von bovinen Epithelzellen entsprach das Medium dem Zellkulturmedium B, welches ebenfalls 1 % D(+)-Mannose, jedoch kein Penicillin, Streptomycin und Gentamicin enthielt (= Zellkulturmedium C). Bei den Zellen wurde unmittelbar vor dem Beginn des Testes ein weiterer Wechsel des entsprechenden Kulturmediums vorgenommen. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml Zellkulturmedium 3 (HEp2-Zellen) bzw. 800 µl Zellkulturmedium C (bovine Kolonkryptenzellen). Die Infektion der Zellen erfolgte durch Zugabe von 20 µl der

stehenden Bakterienkultur je Vertiefung bei HEp2-Zellen bzw. durch Zugabe von 11,4 µl/Vertiefung (15 µl/ml) einer Schüttelkultur mit Zellkulturmedium C bei Kolonkryptenzellen. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei den für die Zelllinie üblichen Kultivierungsbedingungen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die HEp2-Zellen dreimal mit warmem PBS-Puffer, bovine Kolonkryptenzellen dreimal mit Zellkulturmedium C gewaschen (1 ml/Vertiefung). Nach Zugabe von neuem Medium wurden die Ansätze erneut für drei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände der einzelnen Kavitäten entnommen, bei RT für 10 min und 13000 U/min abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Fa. Hettich) und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Der Zellrasen wurde dreimal mit warmem PBS-Puffer bzw. Zellkulturmedium C gewaschen (1 ml/Vertiefung). Daraufhin wurde zur Fixation der Zellen je 1 ml Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (2 % in PBS) je Vertiefung für 30 min zugegeben (RT, feuchte Kammer). Anschließend wurde zweimal mit 1 ml/Vertiefung PBS-Puffer gewaschen. Zur Permeabilisierung erfolgte die Zugabe von 1 ml/Vertiefung Digitonin-Lösung (0,005 % in PBS-Puffer) für 10 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Plattenböden der Kavitäten ausgestanzt, entgratet und zum Färben in eine neue 12-Well Platte überführt. Die Färbung der Zellen erfolgte mit FITC (Fluorescein-Isothiozyanat)-markiertem Phalloidin (Fa. Sigma-Aldrich). Dazu wurden je 50 µl der Gebrauchslösung (2,5 µl Phalloidin-FITC [100 µg/ml in MeOH] in 47,5 µl PBS) je Plattenboden verwendet. Die Färbung wurde in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss bei RT für eine Stunde durchgeführt. Dann wurden die Plattenböden zweimal mit PBS gewaschen, auf Objektträger aufgeklebt und mit einem Eindeckmedium (Mowiol Mounting Medium) sowie einem Deckgläschen versehen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (DM RB, Fa. Leitz). Jeder Bakterienstamm wurde mindestens 2-mal innerhalb eines Versuches getestet, die *E. coli*-Kontrollstämme E2348/69, EDL933 sowie C600 wurden stets mitgeführt. Außerdem enthielt jeder Test mindestens eine Negativkontrolle pro 12-Well Platte, bei der anstelle der Bakterienkultur das gleiche Volumen des sterilen LB-Mediums zugeführt wurde. Ein positives FAS-Signal war dann vorhanden, wenn eine durch Bakterien hervorgerufene fluoreszierende AktinKumulation unterhalb der bakteriellen Anheftungsstelle sichtbar war. Die Zahl der betroffenen Zellen wurde geschätzt. Ein Isolat wurde dann als positiv im Sinne des FAS-Test (FAS-positiv) gewertet, wenn pro Zelle mindestens 10 Signale zu verzeichnen waren, unabhängig von der Zahl der betroffenen Zellen. Außerdem wurde der Anteil der infizierten Zellen geschätzt, und als schwach ($< \frac{1}{3}$ der Zellen), mittel ($\geq \frac{1}{3}$ und $< \frac{2}{3}$) oder stark ($\geq \frac{2}{3}$ der Zellen) eingestuft.

5.3.4 Giemsa-Test

Die Fähigkeit der *E. coli*-Stämme, in Anwesenheit von D(+)-Mannose an HEp2-Zellen zu adhären, wurde mit der Methode von Cravioto *et al.* (55), modifiziert durch Scotland *et al.* (249), ermittelt. Für die Adhäsionsversuche wurden HEp2-Zellen und bovine Kolonkryptenzellen verwendet. Der Test wurde stets parallel zum FAS-Test durchgeführt und verlief bis zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen identisch (Tab. 19). Die ausgestanzten Plattenböden wurden bei diesem Test jedoch mit einer frisch angesetzten Giemsa-Gebrauchslösung (Fa. Merck 10 % in PBS/A. *dest.*, filtriert) für 30-40 min bei RT gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde anschließend durch mehrmaliges Spülen mit A. *dest.* entfernt. Die Präparate wurden an der Luft getrocknet und auf Objektträger aufgebracht. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit Ölimmersion. Auch bei diesem Test wurde jeder Bakterienstamm mindestens 2-mal innerhalb eines Versuches getestet, die *E. coli*-Kontrollstämme E2348/69, EDL933 sowie C600 wurden stets mitgeführt. Jeder Test enthielt mindestens eine Negativkontrolle pro 12-Well Platte (s.o.). Ein Isolat wurde dann als adhären bewertet, wenn pro Zelle mindestens 10 Bakterien anhafteten, unabhängig von der Zahl der infizierten Zellen. Weiterhin wurde die Art der Adhäsion beurteilt. Dabei wurde zwischen lokaler Adhäsion (LA), diffuser Adhäsion (DA) und aggregativer Adhäsion (AA) unterschieden. Der Anteil der infizierten Zellen wurde wie beim FAS-Test beschrieben geschätzt.

Tab. 19: Durchführung der Zell-Adhäsionstests mit bovinen Kolonkryptenzellen

	FAS-Test	Giensa-Test
Tag 1	Aussäen der Zellen: 300-400 Kolonkrypten/cm ²	
Tag 3	Mediumwechsel: Zellkulturmedium B → C Animpfen der Bakterienstämme	
Tag 4	Präinkubation in Zellkulturmedium C u. Einstellung der Ziel-OD bei Bakterienkulturen Mediumwechsel bei Zellen Infektion der Zellen (15 µl/ml Kultur in Zellkulturmedium C) Inkubation 3 h 3 x Waschen (Zellkulturmedium C) Inkubation 3 h Entnahme/Zentrifugation der Überstände 3 x Waschen (Zellkulturmedium C) Fixation (2 % PFA-Lsg.), 30 min, RT, feuchte Kammer 2 x Waschen (PBS) Permeabilisierung (0,005 % Digitonin-Lsg.), 10 min, RT, feuchte Kammer 2 x Waschen (PBS)	
	Färben (FITC-Phalloidin-Gebrauchslösung), 1h, dunkel, RT, feuchte Kammer 2 x Waschen (PBS) Eindecken/Aufkleben der Präparate Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	Färben (10 % Giensa-Lösung) 30-40 min, RT 3-4 x Entfärben mit <i>A. dest.</i> , RT lufttrocknen, Aufkleben der Präparate Lichtmikroskopische Auswertung

5.3.5 Nachweis von Stx in Zellkulturüberständen

Die im Zuge der Adhäsionstests mit bovinen Kolonkryptenzellen gewonnenen Zellkulturüberstände wurden im Vero-ZT auf ihre Zytotoxizität hin überprüft. Der Test glich vom Versuchsaufbau und seiner Durchführung dem Vero-ZT (3.1.2). Die Überstände wurden jeweils im Einfachansatz in einer log₁₀-Verdünnungsreihe in drei Stufen in Zellkulturmedium C verdünnt (Verdünnung je Vertiefung 1:3 bis 1:300). Als Positivkontrolle diente ein *E. coli*-Ultraschall-Lysat des Stammes 2403 (Tab. 7) 1:10 verdünnt in Zellkulturmedium C, die Negativkontrolle enthielt ausschließlich Zellkulturmedium C. In der zweiten Komponente wurde 50 µl Zellkulturmedium 1 in alle Vertiefungen pipettiert. Nach

Durchführung des MTT-Tests wurde die relative Zellaktivität der Ansätze der verschiedenen Überstandsverdünnungen berechnet.

VI Ergebnisse

1 Nachweis von Stx-spezifischen Antikörpern in Serum-, Kolostrum- und Milchproben

1.1 Verozell-Neutralisationstest

1.1.1 Stx1-spezifische Antikörper

Im Rahmen der vorgestellten Studie wurden 33 Muttertiere untersucht. Dabei wurden Kolostrumproben von allen 33, Serumproben von 31 sowie Milchproben von 30 Tieren auf das Vorhandensein Stx-spezifischer Antikörper untersucht. Allen untersuchten Muttertieren wurden absteigend nach der Titerhöhe Stx1-spezifischer neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) ihres Kolostrums Nummern von 1 bis 33 zugewiesen (Anhang, Tab. 27). Den neugeborenen Kälbern dieser Tiere wurde die gleiche Nummer wie ihrem Muttertier zugewiesen (Anhang, Tab. 28). Bei zwei Tieren kam es zu einer Zwillingsgeburt (Muttertiere Nr. 17 und 31). Den beiden Kälbern wurde entsprechend die Nummern 17a und 17b bzw. 31a und 31b zugewiesen. Diese Nummerierung der Versuchstiere wurde bei allen Abbildungen und Tabellen beibehalten.

1.1.1.1 Serum, Kolostrum und Milch der Muttertiere

In allen 31 untersuchten Serumproben von Muttertieren konnten mittels Neutralisationstest Stx1Ak in unterschiedlichen Titerhöhen nachgewiesen werden (Abb. 7).

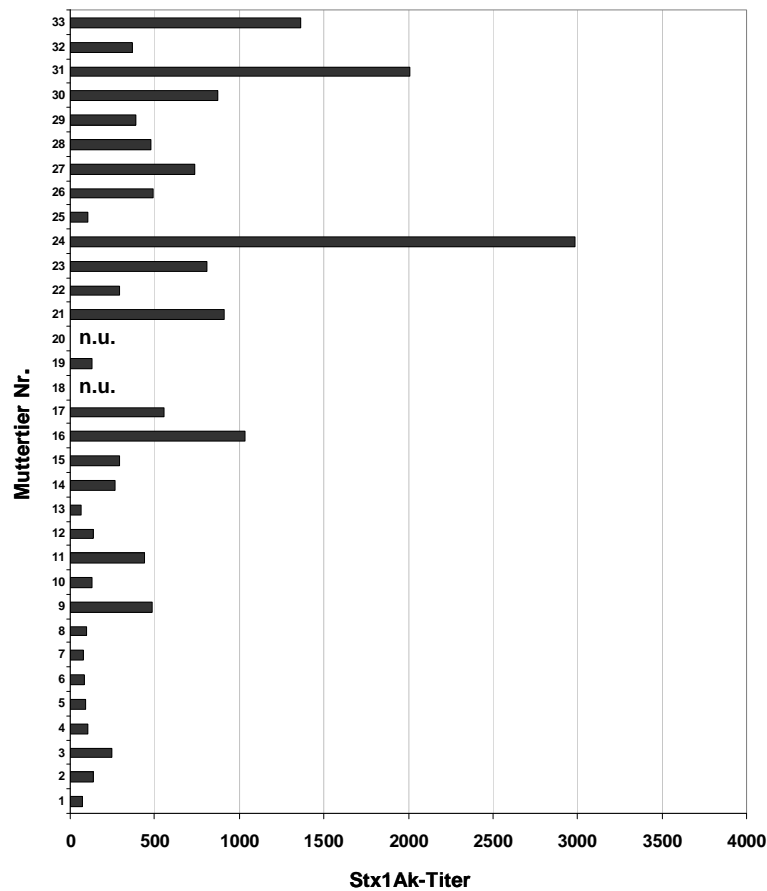


Abb. 7: Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) im Serum der Muttertiere
n.u.: Probe des entsprechenden Tieres wurde nicht untersucht.

Auch in allen 33 untersuchten Kolostrumproben der Mutterkühe konnten diese Antikörper in sehr unterschiedlichen Titerhöhen detektiert werden. In Abb. 8 sind die Titer in absteigender Höhe aufgeführt.

In den innerhalb der ersten vier Wochen nach der Geburt entnommenen Milchproben fanden sich Stx1Ak dagegen nur noch bei 4 von 30 untersuchten Tieren. Die Titerhöhe der positiven Proben betrug stets 30 (Abb. 9).

Eine detaillierte Auflistung aller einzelnen Stx1Ak-Titerwerte in den untersuchten Proben der Muttertiere findet sich im Anhang in Tab. 30.

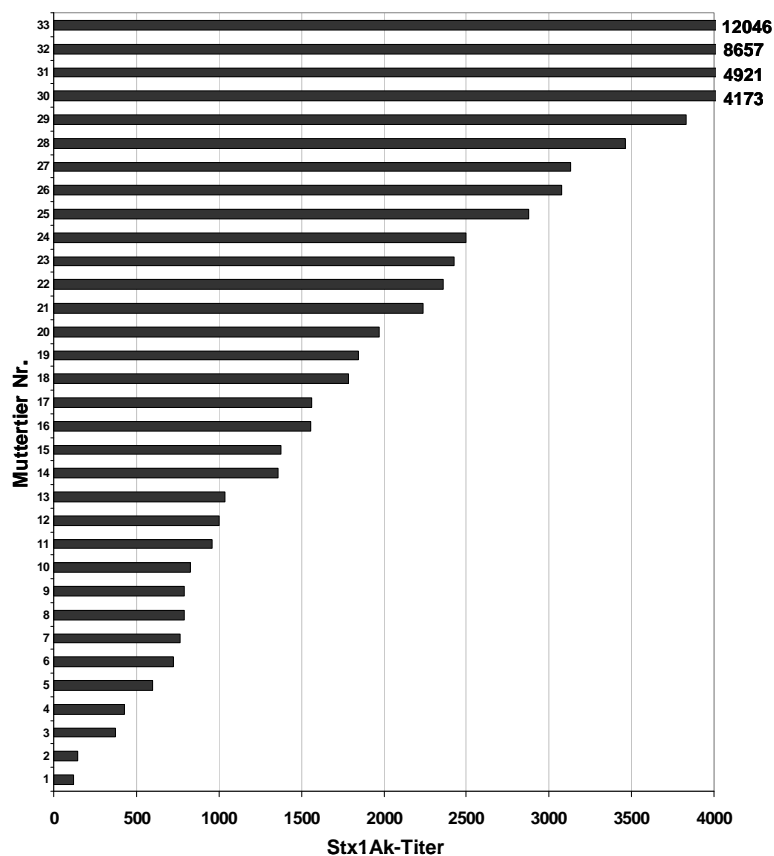


Abb. 8 Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) im Kolostrum der Muttertiere

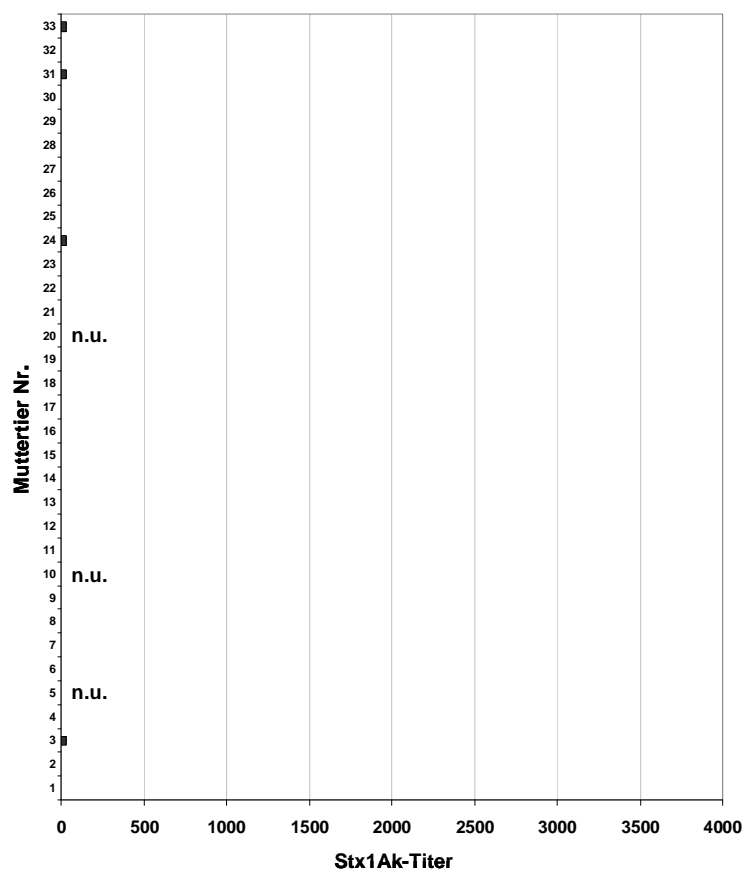


Abb. 9: Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) in der Milch der Muttertiere

n.u.: Probe des entsprechenden Tieres wurde nicht untersucht.

1.1.1.2 Serum der Kälber

Bei den neugeborenen Kälbern konnten in den präkolostral entnommenen Serumproben keine Stx1Ak im Vero-NT nachgewiesen werden. Jedoch waren diese Antikörper in 31 von 34 Proben, die innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und nach der Aufnahme maternalen Kolostrums entnommen wurden, bereits nachweisbar. In Abb. 10 sind die Stx1-spezifischen Antikörpertiter der ersten und zweiten Probenentnahme aller untersuchten Kälber gegenübergestellt. Da in einigen Fällen eine Entnahme von Blut sofort nach der Geburt nicht möglich war, hatten einige Tiere bereits zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme Kolostrum aufgenommen. Sie sind in der Abbildung gesondert gekennzeichnet. Stx1Ak waren bei ihnen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt nachweisbar.

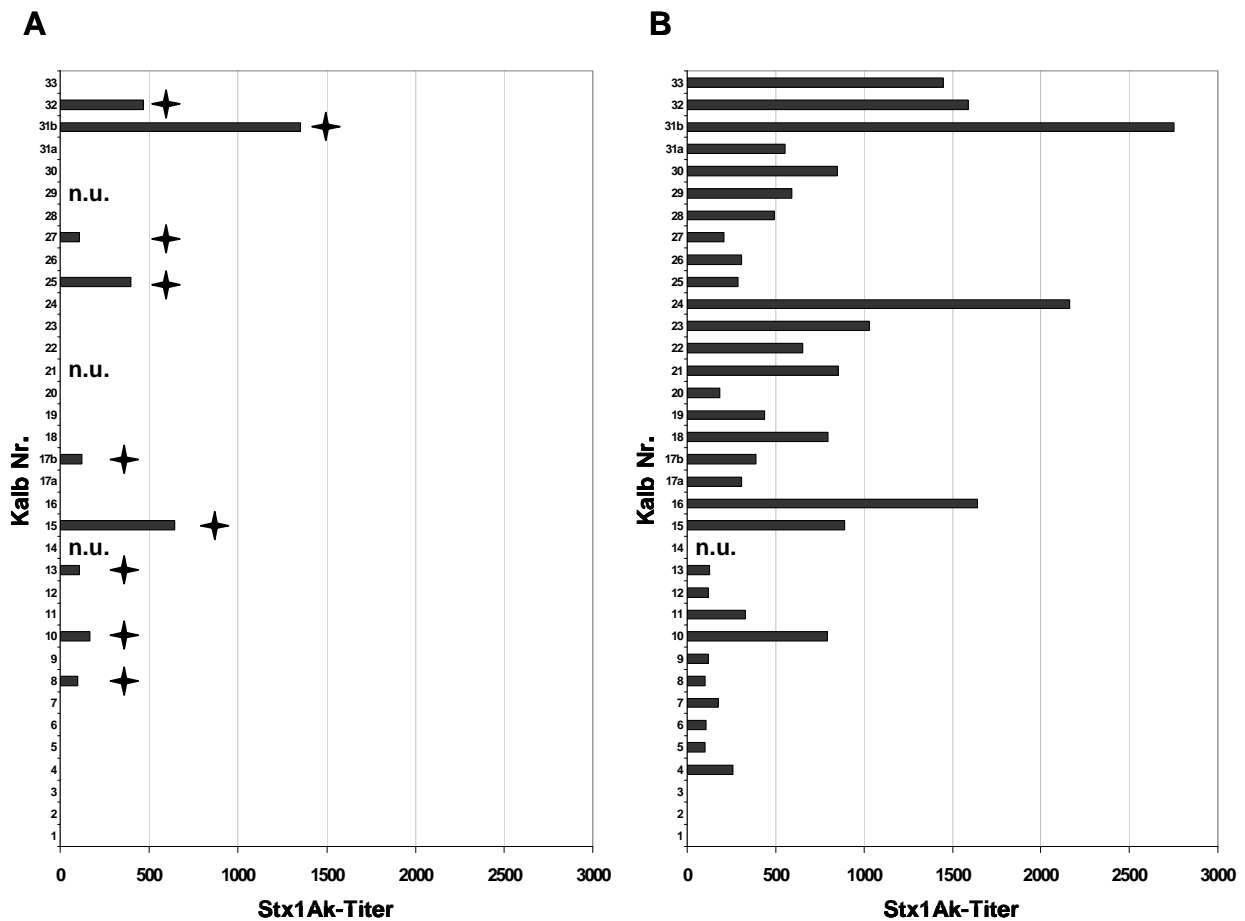


Abb. 10: Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) im Serum neugeborener Kälber

Titer zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (A), **Stern:** Kolostrumaufnahme vor erster Blutentnahme; Titer zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme (innerhalb 24 h und nach Kolostrumaufnahme) (B); **n.u.:** Probe des entsprechenden Tieres wurde nicht untersucht.

Die Titer Stx1Ak aller weiteren entnommenen Serumproben der Kälber sind, zusammen mit den Titern der ersten zwei Entnahmezeitpunkte, in Abb.11 dargestellt. Dabei sind die

errechneten Einzeltiter jedes Entnahmezeitpunktes jeweils eines Kalbes zu einer Titerverlaufskurve zusammengefasst.

Bei zwei von 35 untersuchten Kälbern konnten Stx1Ak zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Bei 32 Kälbern ließen sich solche Antikörper bereits in der ersten oder zweiten entnommenen Serumprobe (Abb. 10), bei einem Tier erst in der 3. Lebenswoche nachweisen. Ein Abfall der Titerhöhe bezogen auf den Maximaltiter nach Kolostrumaufnahme konnte bei allen Tieren innerhalb der ersten drei Lebenswochen, bei einem Kalb in der vierten Lebenswoche beobachtet werden. Mit Ausnahme von drei Kälbern sank bei allen untersuchten Tieren der Antikörpertiter innerhalb des Untersuchungszeitraumes an zwei aufeinander folgenden Entnahmezeitpunkten unter die Nachweisgrenze ab. Zum Ende des dritten Lebensmonats (12. LW) waren Stx1Ak bei 14 (60,9 %) der noch 23 beprobten Tiere nicht mehr nachweisbar. Bei 8 von 9 Tieren, die zu diesem Zeitpunkt einen Stx1Ak-Titer aufwiesen, war dieser gemessen am Maximaltiter nach Kolostrumaufnahme, deutlich um das 6,7-17,0-fache reduziert.

Zu einer Stx1-spezifischen Serokonversion innerhalb des Untersuchungszeitraumes kam es bei nur 5 der untersuchten Kälber. Bei drei Kälbern konnten zu jedem Untersuchungszeitpunkt Stx1Ak nachgewiesen werden.

Eine detaillierte Auflistung aller einzelnen Stx1Ak-Titerwerte für jeden Zeitpunkt und für alle untersuchten Kälber findet sich im Anhang in Tab. 31.

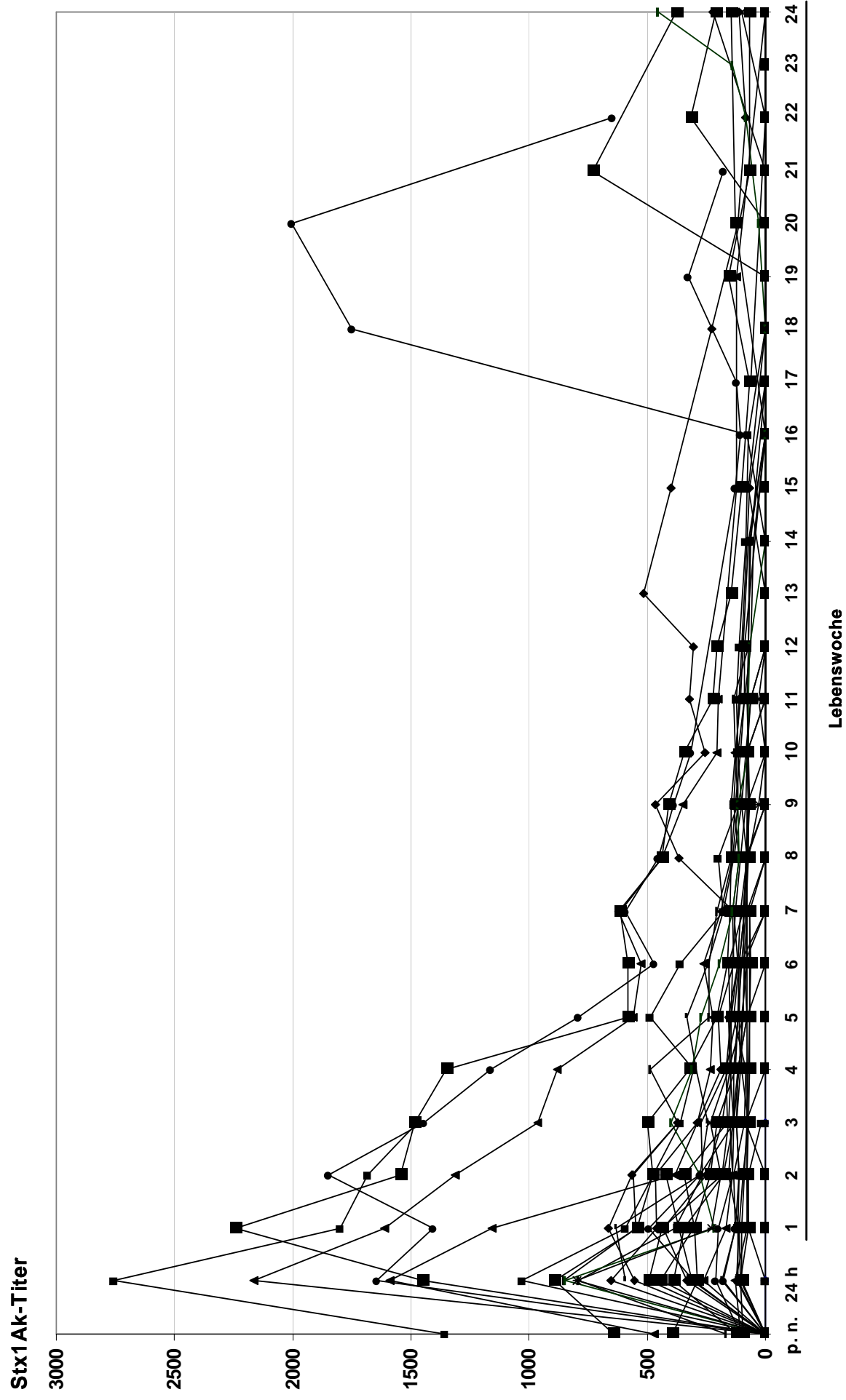


Abb. 11: Verlauf der Stx1Ak-Titer aller Kälber bis zur 24. Lebenswoche

p.n.: post natum (erste Probenentnahme nach der Geburt); 24 h: Titer zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme (innerhalb 24 h und nach Kolostrumaufnahme).

1.1.1.3 Serum weiterer Tiere

Aufgrund der geringen Anzahl von serokonvertierten Kälbern selbst nach sechsmonatiger Beprobung der Tiere einerseits und der hohen Frequenz von Stx1Ak bei adulten Muttertieren andererseits, sollte das Vorkommen dieser Antikörper bei Tieren, die älter als sechs Monate sind, genauer überprüft werden. Dazu wurden 33 Serumproben von älteren Tieren des gleichen Bestandes auf das Vorhandensein von Stx1Ak hin untersucht. In Abb. 12 sind die Titerhöhen dieser Antikörper bei den einmalig entnommenen Proben gegen das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufgetragen. Die Darstellung beinhaltet zusätzlich auch die Titerwerte der 31 untersuchten Serumproben der Muttertiere (Abb. 7), welche jedoch mit anderen Symbolen gekennzeichnet sind. Eine detaillierte Aufführung der Titerwerte dieser Tiere findet sich im Anhang in Tab. 33 bzw. Tab. 30.

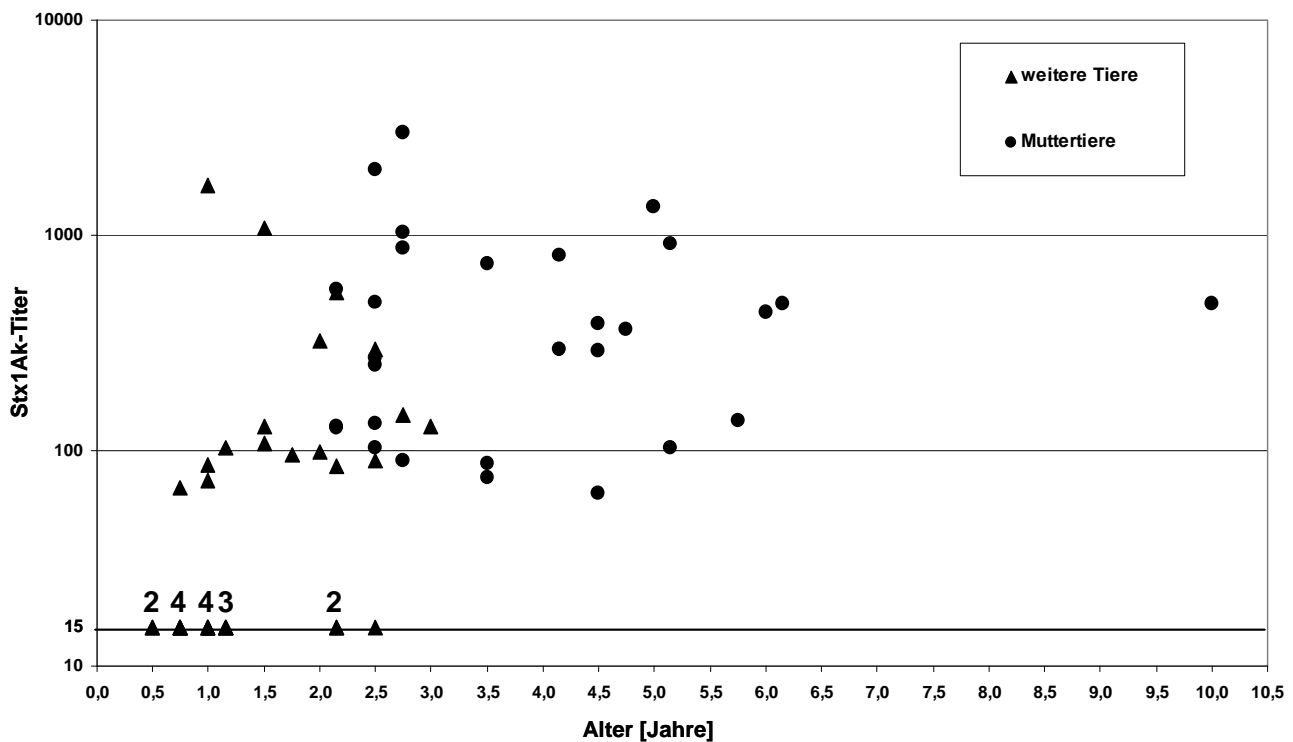


Abb. 12: Titer Stx1-spezifischer neutralisierender Antikörpern im Serum von über 6 Monate alten Tieren

Werte von 15: kein Nachweis von Stx1Ak; Zahlenwerte über den Datenpunkten entsprechen der Anzahl gleich alter Tiere, bei denen kein Nachweis von Stx1Ak gelang.

Es zeigte sich, dass zahlreiche Tiere ab dem 6. Lebensmonat einen Stx1Ak-Titer aufwiesen. Der Anteil der Tiere, bei denen keine Stx1Ak detektierbar waren, nahm mit zunehmendem Alter ab. So wiesen 13 Tiere bis zu einem Alter von eineinhalb Jahren keinen Stx1Ak-Titer

auf, bei allen älteren Tieren hingegen war dies nur drei Mal der Fall. Bei über 2,5 Jahre alten Tieren konnte schließlich immer ein entsprechender Antikörpergehalt festgestellt werden. Andererseits ließen sich Titer von über 1000 schon bei einzelnen einjährigen Tieren nachweisen.

1.1.2 Stx2-spezifische Antikörper

1.1.2.1 Serum, Kolostrum und Milch der Muttertiere

In nur 3 von 31 Serumproben der untersuchten Muttertiere konnten Stx2-spezifische neutralisierende Antikörper (Stx2Ak) im Vero-NT nachgewiesen werden (Abb. 13). Während diese Antikörper in 8 von 33 untersuchten Kolostrumproben in einer Titerhöhe von jeweils 30 nachweisbar waren (Abb. 13), konnten sie in keiner der 30 untersuchten Milchproben mehr detektiert werden (Anhang, Tab. 30).

1.1.2.2 Serum der Kälber

Stx2-spezifische Antikörper konnten ausschließlich in den postkolostralen Serumproben von Kälbern der drei seropositiven Muttertiere detektiert werden (Abb. 13). Sie waren bei diesen Kälbern jedoch nur bis zur zweiten Probenentnahme, bis zur siebten bzw. bis zur neunten Lebenswoche und stets mit einem niedrigen Titer von 30 nachweisbar. Bei keinem der Kälber kam es während des gesamten Untersuchungszeitraumes zu einer Stx2-spezifischen Serokonversion (Anhang, Tab. 32).

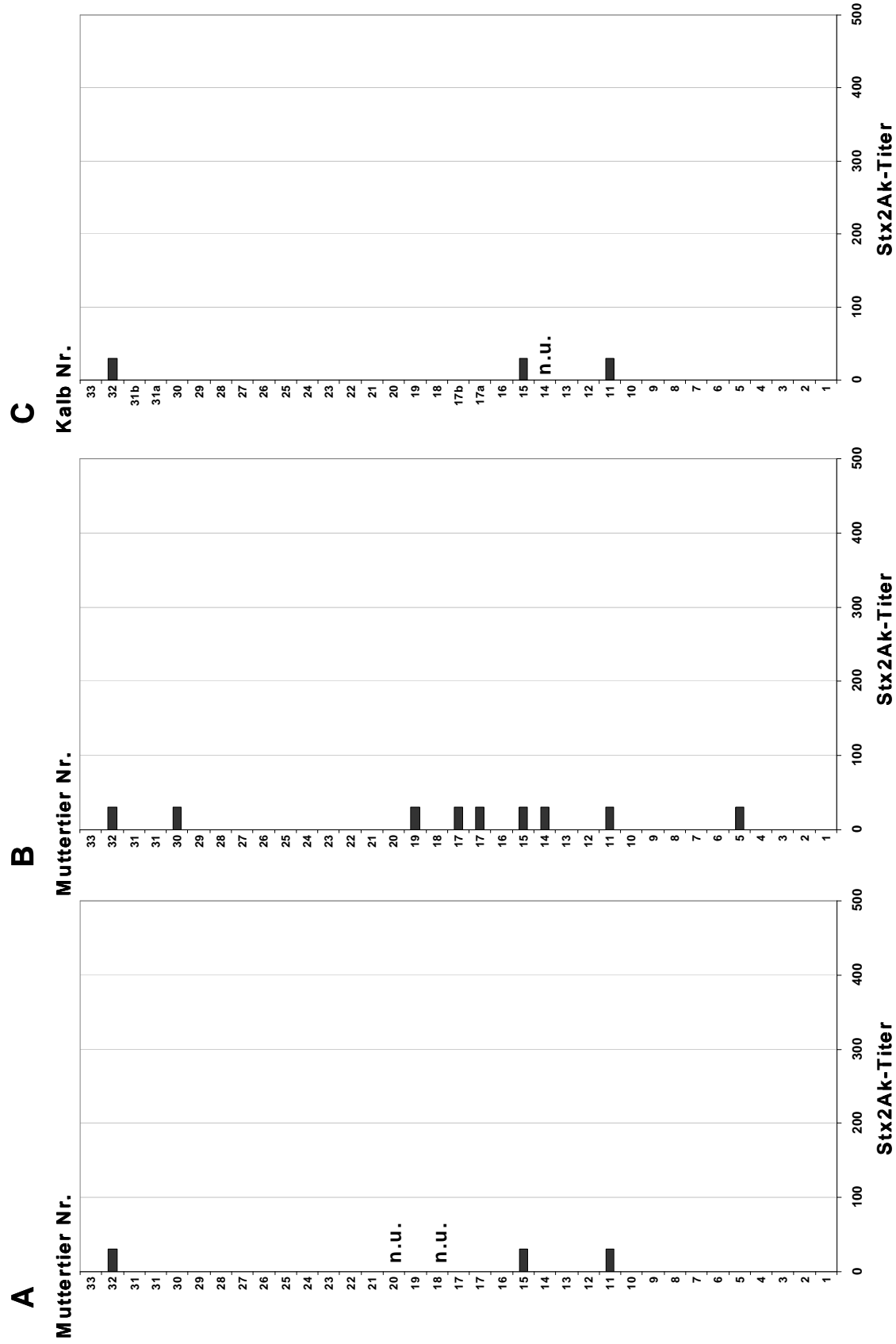


Abb. 13: Titer Stx2-spezifischer neutralisierender Antikörper (Stx2Ak)

Serum der Muttertiere (A); Kolostrum der Muttertiere (B); Serum der Kälber 24 h nach der Geburt und Kolostrumaufnahme (C); Muttertiere #17 u. #31 sind in Diagrammen A und B doppelt aufgeführt, da ihnen je 2 Kälber zugeordnet sind (17a/b bzw. 31a/b); **n.u.:** Probe des entsprechenden Tieres wurde nicht untersucht.

1.1.2.3 Serum weiterer Tiere

Die 33 Serumproben der über 6 Monate alten Tiere (1.1.1.3), wurden auch im Vero-NT gegen Stx2 untersucht. Bei diesen Tieren konnten Stx2Ak in nur einem Fall und mit einem niedrigen Titer von 30 festgestellt werden. (Anhang, Tab. 33).

1.1.3 Stx2c-spezifische Antikörper

Aufgrund der geringen Nachweisbarkeit von Stx2Ak in den Proben der Muttertiere und ihrer Kälber sollte überprüft werden, ob dies auch für spezifische Antikörper gegen die Stx2-Variante Stx2c gilt. Es erfolgte die Überprüfung aller Muttertierkolostrum gegen ein Stx2c-haltiges *E. coli*-Ultraschall-Lysat (Kapitel V3.2.2) im Vero-NT.

Jedoch konnte nur in der Kolostrumprobe eines Muttertieres (Nr. 15) eine neutralisierende Aktivität gegenüber dem verwendeten Stx2c-Lysat nachgewiesen werden. Die relative Zellaktivität lag bei 42 % weshalb die Probe laut Definition mit einem Neutralisationstiter von 30 bewertet wurde (Anhang, Tab. 30).

1.2 Kompetitiver ELISA

1.2.1 Stx1-spezifische Antikörper

Im kompetitiven ELISA erfolgte die Untersuchung ausgewählter Kälber-Serumproben (insgesamt 29 Serumproben von 2 Kälbern) gegen ein Stx1-haltiges *E. coli*-Ultraschall-Lysat (Kapitel V3.2.2). Die Werte der relativen inhibitorischen OD (relIHOD) der überprüften Seren sind im Anhang in Tab. 34 aufgeführt. Die Ergebnisse für die Seren des Kalbes Nr. 15 sind in Abb. 14 exemplarisch als Verlaufskurve dargestellt. Im Diagramm abgebildet ist zum Vergleich auch die mittels Vero-NT ermittelte Titerverlaufskurve für die gleichen Serumproben dieses Kalbes.

Beim Vergleich beider Methoden ist zu beachten, dass für den kompetitiven ELISA keine Nachweisgrenze festgelegt wurde. In diesem Verfahren wurde die Reduktion der optischen Dichte (relIHOD) bestimmt, wobei stets die gleiche Serumverdünnung verwendet wurde. Die Bestimmung des Antikörpertiters auf der Grundlage einer Probenverdünnungsstufe, ähnlich wie im Vero-NT, war deshalb nicht möglich.

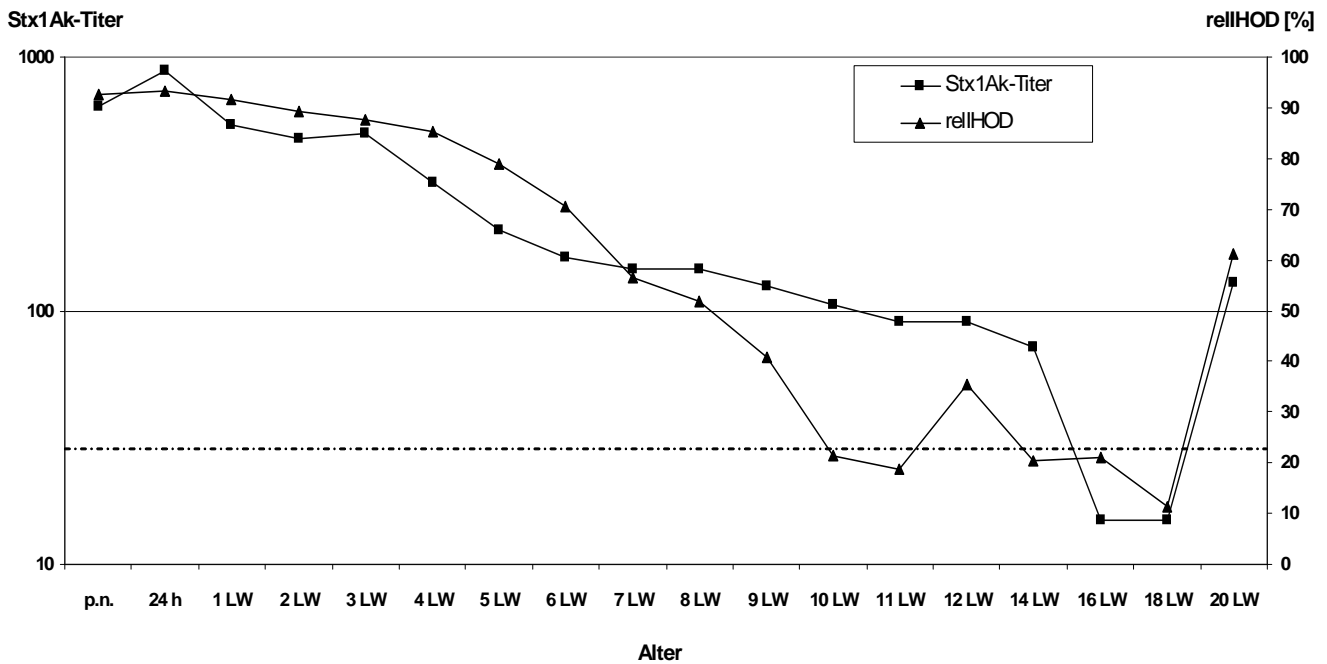


Abb. 14: Nachweis Stx1-spezifischer Serumantikörper im kompetitiven ELISA

Verlaufskurve der relIHOD-Werte (kompetitiver ELISA) sowie Titerverlaufskurve (Vero-NT) der Seren von Kalb Nr. 15.; gestrichelte Linie zeigt die Nachweisgrenze des Vero-NT (30); **LW**: Lebenswoche; **p.n.**: post natum (erste Probenentnahme nach der Geburt); **24 h**: Titer zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme (innerhalb 24 h und nach Kolostrumaufnahme).

1.2.2 Stx2-spezifische Antikörper

Ein kompetitiver ELISA mit Stx2-haltigem Lysat wurde mit insgesamt 17 Serumproben von 2 Kälbern und einem Muttertier durchgeführt, welche im Vero-NT einen Stx2Ak-Titer von 30 aufwiesen. Aufgrund der insgesamt geringen Nachweisbarkeit von Stx2Ak im Vero-NT, wurden auch 20 im Neutralisationstest Stx2Ak-negative Seren in die Untersuchung einbezogen. Damit sollten mögliche falsch negative Ergebnisse des Vero-NT ausgeschlossen werden. Es wurden dazu Seren von Kälbern verwendet, bei denen bereits mehrmals *stx2*-STEC im Kot nachgewiesen wurden, und welche deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits Kontakt zum Antigen Stx2 hatten.

Bei allen im Vero-NT Stx2Ak-negativen Serumproben, erfolgte auch im kompetitiven ELISA gegen das Stx2-haltige Lysat keine Reduktion der relOD. Bei den im Vero-NT mit einem Stx2Ak-Titer von 30 bewerteten Serumproben des Kalbes Nr. 15 sowie der Serumprobe des Muttertieres Nr.15 konnten dagegen auch im ELISA Reduktionen der relOD (= relIHOD) bis zu 27 % festgestellt werden. Keine Reduktion der relOD erfolgte dagegen bei den Vero-NT positiven Serumproben des Kalbes Nr. 11.

Die ermittelten relIHOD-Werte für die Seren des Kalbes Nr.15 sind in Abb. 15 graphisch dargestellt. Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse der entsprechenden Serumproben im Verozell-NT gegen Stx2. Sie sind jedoch in dieser Abbildung nicht in Form von Titerwerten sondern als relative Zellaktivität in % (in der Verdünnungsstufe 1:30) dargestellt. Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse findet sich in der Tab. 35 im Anhang.

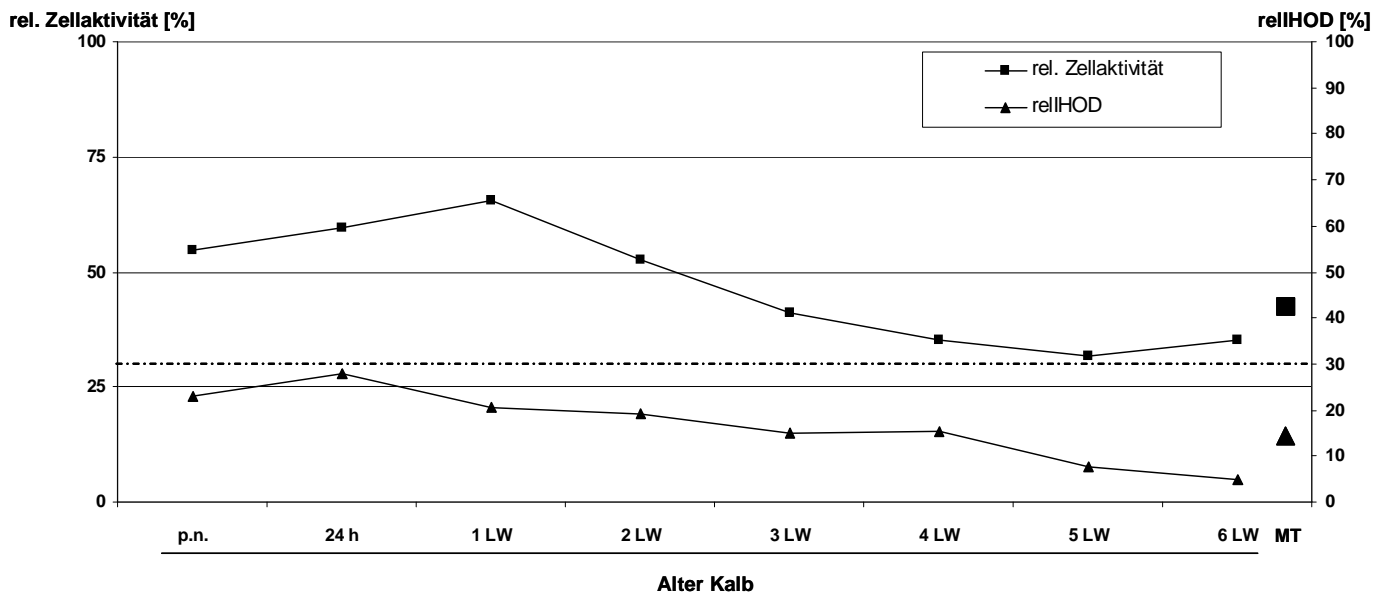


Abb. 15: Nachweis Stx2-spezifischer Antikörper im kompetitiven ELISA

Verlaufskurve der relIHOD-Werte (kompetitiver ELISA) sowie der relativen Zellaktivität (Vero-NT) ausgewählter Seren bei Kalb Nr. 15 sowie Serum des Muttertieres Nr. 15; gestrichelte Linie kennzeichnet die Nachweisgrenze des Vero-NT (rel. Zellaktivität 30 % für einen entsprechenden Titer von 30); **MT**: Serum des Muttertieres; **h**: Stunden nach der Geburt; **LW**: Lebenswoche.

1.2.3 Stx2c-spezifische Antikörper

Insgesamt 41 Kälberseren wurden im kompetitiven ELISA mit dem Stx2c-haltigen *E. coli*-Ultraschall-Lysat auf das Vorhandensein von Stx2c-spezifischen Antikörpern überprüft. Auch hierbei handelte es sich um Serumproben von Tieren, die bereits mehrfach positiv auf das Ausscheiden von *stx2c*-STEC getestet worden waren. Eine Reduktion der relOD konnte jedoch bei keinem getesteten Serum festgestellt werden (Tab. 36; Anhang). Mit zwei Ausnahmen wurden alle überprüften Seren im ELISA auch gegen das Stx2-haltige Lysat getestet. Bei den Seren, die eine Reduktion der relOD gegen Stx2 hervorriefen, konnte dies nicht gegen das Stx2c-haltige Lysat beobachtet werden.

1.3 Western Blot/Immunofärbung

1.3.1 Stx1-spezifische Antikörper

Seren von Kälbern und Muttertieren wurden mittels Immunoblot auf das Vorhandensein Stx1-spezifischer Immunglobuline verschiedener Isotypen überprüft. Insgesamt wurden 23 Kälber- und Muttertierseren gegen das auf eine Nitrozellulosemembran geblottete Stx1 getestet. In den Test wurden jeweils das Serum eines Muttertieres, das Serum seines neugeborenen Kalbes unmittelbar nach der Geburt, sowie das Serum des Kalbes zu einem Zeitpunkt nach der 18. Lebenswoche eingesetzt. Damit sollte zum einen die Zusammensetzung verschiedener Stx1-spezifischer Immunglobulin-Isotypen im maternalen Serum sowie im Serum ihrer neugeborenen Kälber nach Kolostrumaufnahme untersucht werden. Gleichzeitig sollte durch die Untersuchung von Kälberseren zu einem späteren Zeitpunkt die Zusammensetzung der endogen gebildeten Stx1-spezifischen Immunglobuline betrachtet werden. Zusätzlich wurden ein präkolostrales Serum (Kalb Nr. 12, p.n.) sowie ein Einzelserum eines Kalbes nach Kolostrumaufnahme (Kalb Nr. 1, 1. LW) mit diesem Verfahren getestet

In Abb. 16 ist beispielhaft für alle untersuchten Seren das Ergebnis einer Immunofärbung des geblotteten Stx1 zu sehen.

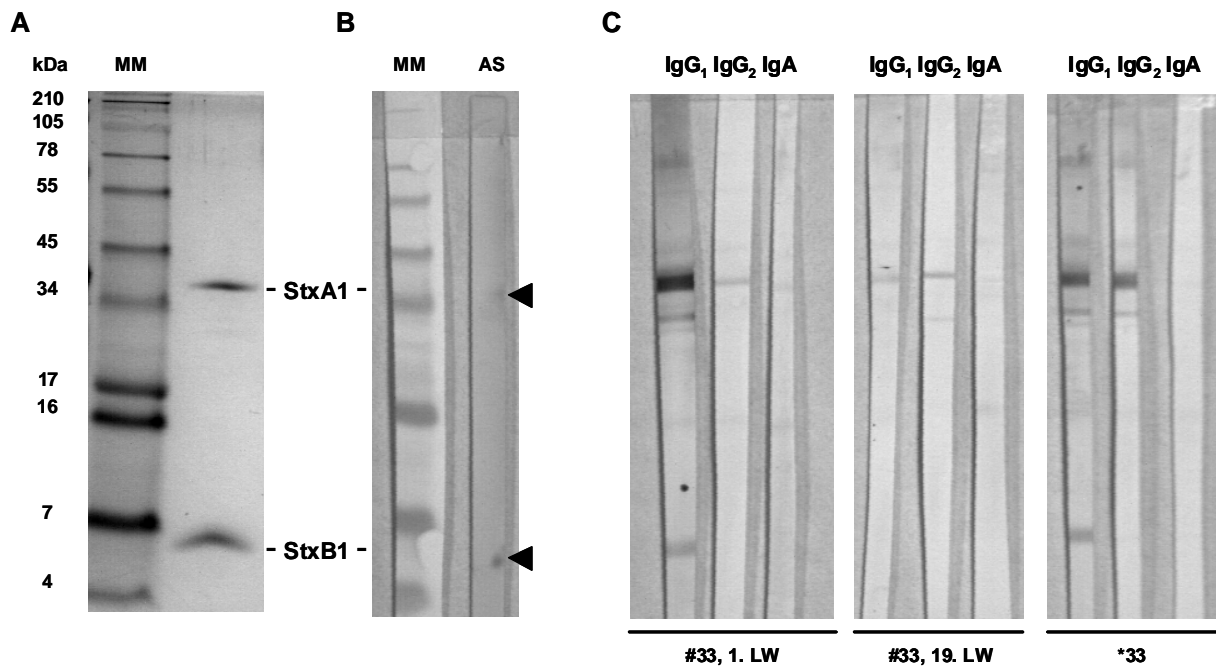


Abb. 16: Nachweis Stx1-spezifischer Antikörper im Western Blot/Immunofärbung

Tricine-PAGE Stx1, Auftrennung in StxA1 und StxB1-Untereinheiten (A); Marker und Protein nach Western Blot, Marker nativ, Untereinheiten mit Amidoschwarz gegengefärbt (B); Immunofärbung des Western Blots (C), Seren des Kalbes #33 postkolostral und 19. LW sowie des Muttertieres *33; Bewertung der Bandenstärke siehe Tab. 20; **AS**: Amidoschwarzfärbung; **kDa**: Kilodalton; **LW**: Lebenswoche; **MM**: Molekularmassenstandard SeeBlue® Plus; **Stx1A**: A-Untereinheit von Stx1; **Stx1B**: B-Untereinheit von Stx1.

Die Ergebnisse aller untersuchten Seren sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Mithilfe des Immunoblot-Verfahrens konnten Stx1-spezifische Immunglobuline in allen untersuchten Muttertierseren nachgewiesen werden. Bei drei der 7 untersuchten Seren konnten Antikörper sowohl gegen die A- als auch die B-Untereinheit von Stx1 (StxA1/StxB1) detektiert werden. Vier Seren wiesen Antikörper ausschließlich gegen StxA1 auf. Bei allen untersuchten Tieren waren spezifische Immunglobuline der Klasse IgG₁ sowie IgG₂ detektierbar. IgA-Immunglobuline konnten allerdings nur schwach bei 4 Muttertierseren nachgewiesen werden. IgG₁ und IgG₂-Antikörper richteten sich gegen die A- und/oder die B-Untereinheit während Stx1-spezifische IgA-Moleküle nur gegen StxA1 nachweisbar waren.

In dem präkolostralen Kälberserum konnten keine Stx1-spezifischen Immunglobuline detektiert werden.

Dagegen fanden sich Stx1-spezifische Antikörper regelmäßig in den Kälberseren nach der Geburt und Kolostrumaufnahme (24 h p.n. bzw. 1. LW). Ein schwach positives Ergebnis konnte auch für ein Kälberserum beobachtet werden, das keinen Titer im Vero-NT aufwies.

Tab. 20: Stx1-spezifische Antikörper im Serum von Kälbern und Muttertieren

MT/Kalb Nr.; Zeitpunkt der Probenentnahme	Stx1Ak-Titer Vero-NT	Western Blot/Immunofärbung		
		α bov IgG ₁	α bov IgG ₂	α bov IgA
#11; 1. LW	433	A++, B++	A++	A+
#11; 12 Monate	1706	A+++	A++, B+	-
*11	594	A++, B+	A++, B+	A+
#15; 24 h p.n.	891	A+++	A++	A++, B++
#15; 11,5 Monate	73	A+++	A++	A+
*15	293	A++	A++	-
#32; 24 h p.n.	1590	A+++ , B+	A+	A+++ , B+
#32; 24. Lebenswoche	15	A++	A++	A+
*32	367	A++ , B+	A+++	A+
#33; 1. LW	2240	A+++ , B++	A++	A+
#33; 19. Lebenswoche	154	A++	A++	-
*33	1362	A+++ , B++	A++	-
#3; p.n.	15	-	-	-
#3; 24 h p.n.	15	A+	A+	A+
#3; 10 Monate	15	A++	A++	A+
*3	150	A++	A++	A+
#12; 24 h p.n.	118	A++	A++	A++
#12; 20. Lebenswoche	2004	A++	A++	A+
*12	137	A++	A++	A+
#24; 24 h p.n.	2163	A++	A++	A++
#24; 24. Lebenswoche	15	A++	A++	-
*24	2986	A++	A++	-
#1; 1. LW	74	A+	A+	-

Erläuterungen: #: Kalb Nr.; *: Muttertier Nr.; **A:** Reaktion auf Höhe der A-Untereinheit von Stx1 (StxA1); **B:** Reaktion auf Höhe der B-Untereinheit von Stx1 (StxB1); Beurteilung der Bandenstärke von negativ (-) bis sehr stark (+++); **α bov IgG₁/IgG₂/IgA:** Nachweis von Stx1-spezifischen bovinen Antikörpern der Subklassen IgG₁/IgG₂/IgA; **LW:** Lebenswoche; **24 h p.n.:** Serum der zweiten Probenentnahme innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt und Kolostrumaufnahme; **p.n.:** Serum der ersten Probenentnahme unmittelbar nach der Geburt

Postkolostral waren StxA1-spezifische Immunglobuline bei allen, StxA1 und StxB1-spezifische Antikörper bei vier Kälbern nachweisbar. StxB1-Antikörper waren stets dann in postkolostralen Seren detektierbar, wenn auch das Serum des Muttertieres solche Antikörper

enthielt. Spezifische Immunglobuline der Klasse IgG₁ richteten sich entweder gegen die A- oder die B-Untereinheit von Stx1. IgG₂-spezifische Antikörper konnten in sämtlichen postkolostralen Seren nur schwach detektiert werden und waren ausschließlich gegen StxA1 nachweisbar. IgA-Immunglobuline waren regelmäßig nachweisbar und richteten sich entweder gegen StxA1 oder StxB1. Die Stx1-spezifischen IgA-Signale in den postkolostralen Seren der Kälber waren stets stärker als diejenigen in Seren der Muttertiere oder älterer Kälber.

In den Seren der Kälber, welche älter als 18 Wochen waren, konnten Stx1-spezifische Immunglobuline ebenfalls regelmäßig nachgewiesen werden. Es konnten solche Immunglobuline auch in drei Serumproben detektiert werden, bei denen der Vero-NT ein negatives Ergebnis für Stx1Ak lieferte.

Antikörper gegen StxB1 waren in nur einem einzigen Serum und mit nur sehr schwachem Signal nachweisbar. StxA1-spezifische Immunglobuline fanden sich dagegen in allen untersuchten Seren älterer Kälber.

Immunglobuline der Klassen G₁ und A waren stets StxA1-spezifisch. Bei dem einzigen Serum mit Antikörpern gegen die B-Untereinheit, waren dies Immunglobuline der Klasse IgG₂.

2 Nachweis der STEC-Ausscheidung

2.1 Kotuntersuchungen mittels PCR

2.1.1 *stx1/stx2*-Multiplex-PCR

In Kotproben von 29 der 35 Kälber konnten im Untersuchungszeitraum mindestens einmal und an bis zu elf aufeinander folgenden Zeitpunkten Stx1- oder Stx2-Gene nachgewiesen werden. Bei Kälbern, bei denen kein Nachweis von Stx-Genen gelang (#1, 10, 20, 26, 31a, 31b) handelte es sich ausnahmslos um Tiere, deren Beprobung aufgrund des Ausscheidens aus dem Bestand vorzeitig abgebrochen werden musste.

In Abb. 17 sind die Ergebnisse der Kotuntersuchung mittels *stx1/stx2*-Multiplex-PCR für alle Kälber im gesamten Untersuchungszeitraum sowie für die Muttertiere vor und nach der Geburt zusammenfassend dargestellt.

In Abb. 18 ist die Anzahl der *stx*-ausscheidenden (*stx1* und/oder *stx2*) Tiere einer Altersstufe dargestellt. Ebenfalls abgebildet ist die kumulative Anzahl der Tiere, die bis zum jeweiligen Alter mindestens einmal positiv auf das Vorhandensein von *stx* im Kot getestet worden waren. So waren bei 5 Kälbern *Stx*-Gene bereits innerhalb der ersten 24 Lebensstunden in Kotproben nachweisbar. Bis zur 7. Lebenswoche hatten bereits 20 Tiere, bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes alle 29 bis zur 24. Lebenswoche beprobten Tiere mindestens einmal *stx* ausgeschieden. Da die Anzahl der Kälber, welche in einem bestimmten Alter beprobt wurden, schwankte, ist zusätzlich der prozentuale Anteil der Tiere mit *stx*-Nachweis im Kot bezogen auf die Anzahl der in dieser Altersstufe tatsächlich beprobten Kälber, dargestellt.

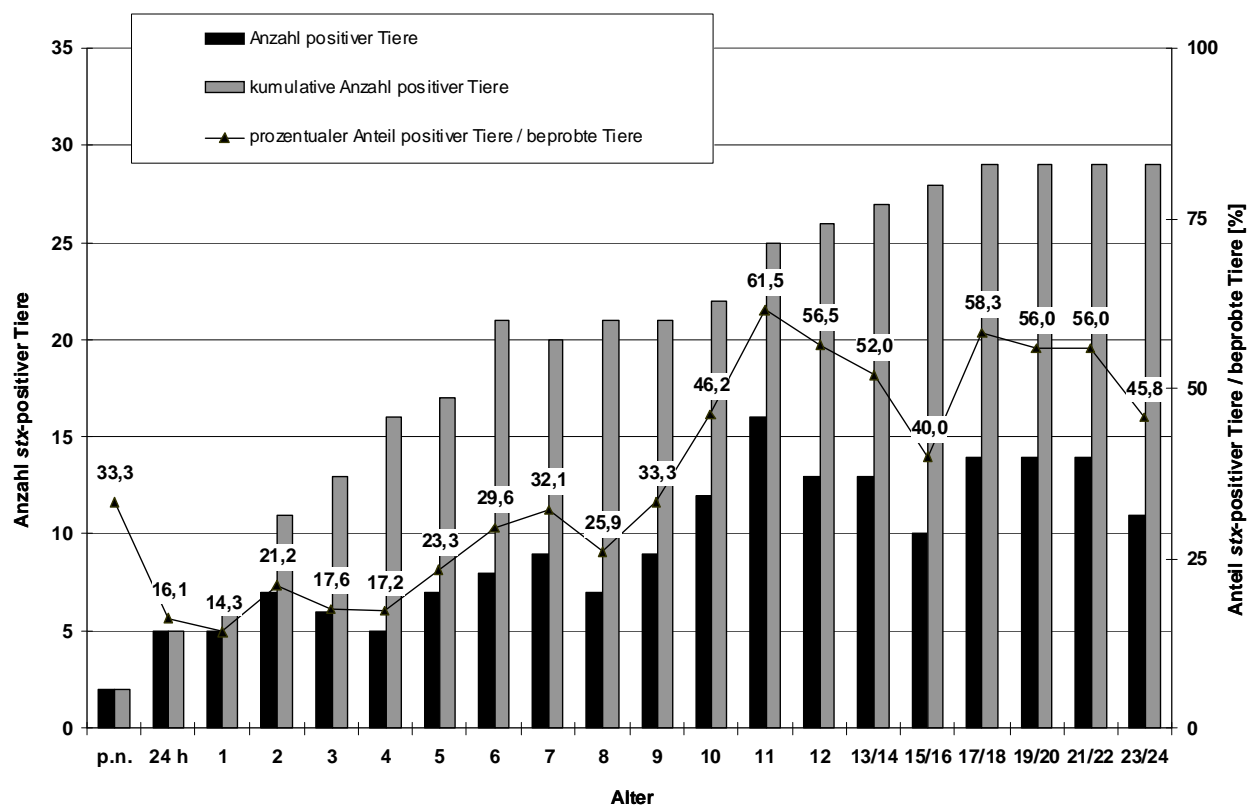


Abb. 18: *stx*-ausscheidende Kälber verschiedener Altersstufen

Anzahl und kumulative Anzahl *stx*-positiver Tiere sowie prozentualer Anteil *stx*-positiver Tiere an beprobten Tieren im jeweiligen Alter; **p.n.:** post natum (erste Probenentnahme); **24 h:** Probe innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und nach Kolostrumaufnahme.

Gene für *Stx1* konnten im Untersuchungszeitraum insgesamt bei 25 Kälbern nachgewiesen werden. In Abb. 19 ist die Anzahl der *stx1*- bzw. der *stx2*-positiven Tiere und die kumulative Anzahl der Tiere, die bis zum jeweiligen Altersabschnitt mindestens einmal positiv auf das Vorhandensein von *stx1* bzw. *stx2* im Kot getestet worden waren, dargestellt.

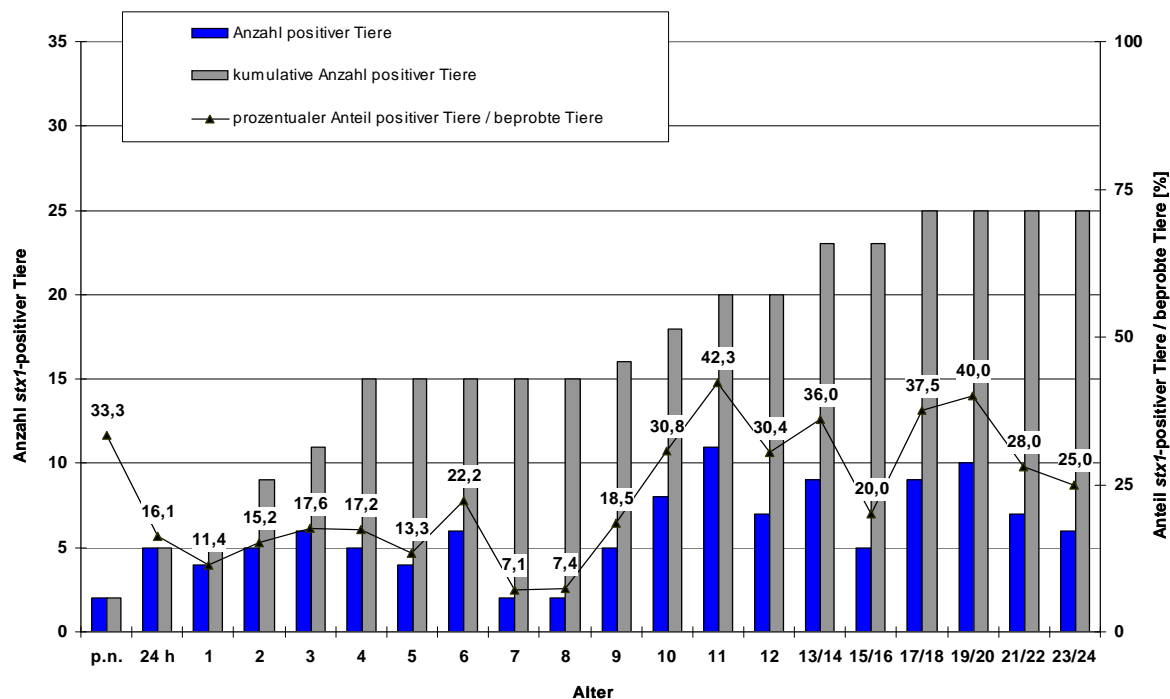
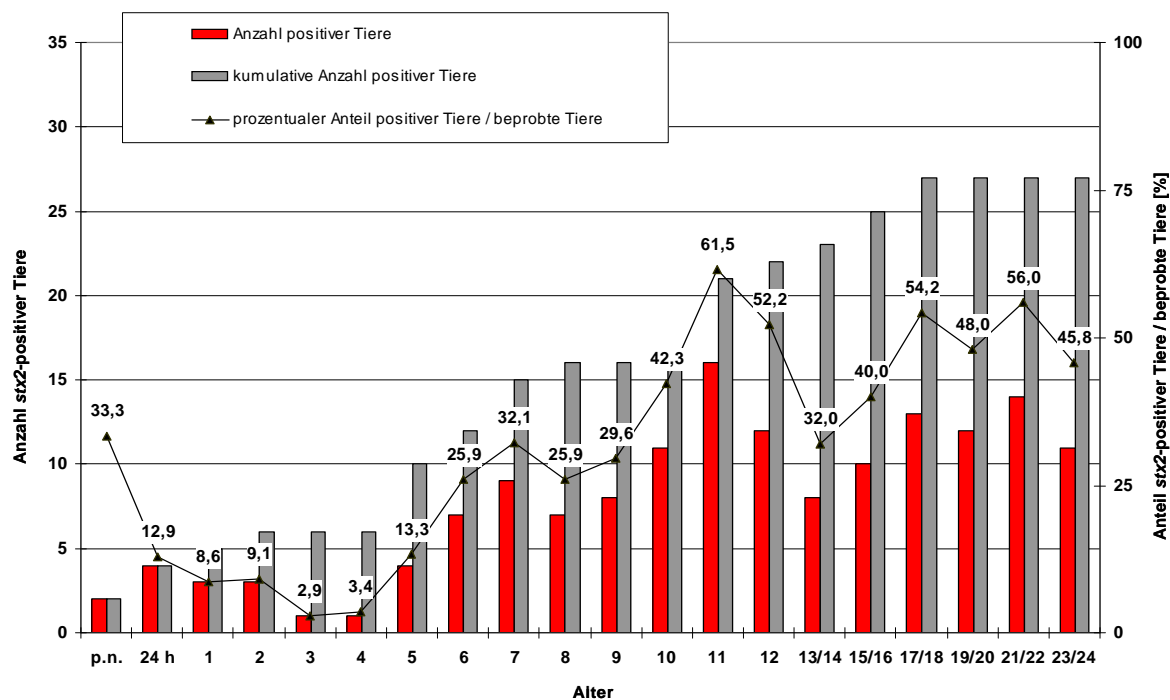
A**B**

Abb. 19: *stx1*- bzw. *stx2*-ausscheidende Kälber verschiedener Altersstufen

Anzahl und kumulative Anzahl sowie prozentualer Anteil positiver Tiere an beprobten Tieren im jeweiligen Alter bei *stx1*- (A) bzw. *stx2*-ausscheidenden (B) Tieren; **p.n.:** post natum (erste Probenentnahme); **24 h:** Probe innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und nach Kolostrumaufnahme.

Auffällig bei der Ausscheidung von *stx1*-STEC ist, dass am Anfang der Untersuchungsperiode zwar stets nur eine geringe Anzahl von Tieren positiv getestet worden

ist, dass dabei jedoch verschiedene Tiere des untersuchten Tierkollektives betroffen waren. So haben 15 untersuchte Kälber bereits in den ersten vier Lebenswochen mindestens einmal *stx1*-STEC ausgeschieden.

Insgesamt sind mit 27 Tieren mehr Kälber mindestens einmal positiv auf das Vorhandensein von *stx2* getestet worden, als dies für *Stx1*-Gene der Fall war. Auffällig ist auch, dass die Anzahl von *stx2*-STEC ausscheidenden Tieren anfangs gering war. So waren im Vergleich zu *stx1* bis zur 4. Lebenswoche insgesamt nur 6 Tiere, und erst im Alter von 7 Wochen insgesamt 15 Tiere positiv.

2.1.2 *stx2*-Typisierungs-PCRs

Insgesamt wurden 205 Proben, welche ein positives Ergebnis für das Vorhandensein von *Stx2*-Genen in der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR lieferten, den verschiedenen *stx2*-Typisierungs-PCRs unterzogen. Der Subtyp *stx2* konnte bei Kälbern in insgesamt 118 Kotproben, bei Muttertieren in 2 Kotproben detektiert werden, der Nachweis des Subtypes *stx2c* gelang insgesamt 104-mal in Kotproben von Kälbern und 4-mal in Muttertierproben. In 3 Muttertierkotproben konnten außerdem Gene der *stx2*-Variante *stx2d* nachgewiesen werden. Die Subtypen *stx2e* und *stx2f* konnten in keiner Kotprobe nachgewiesen werden. Bei 23 Kälber- und einer Muttertierprobe konnte der *stx2*-Subtyp mittels Typisierungs-PCR nicht ermittelt werden. Hier konnten trotz eines positiven Signals für *stx2* in der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR keine eindeutigen Ergebnisse in den *stx2*-Typisierungs-PCRs erzielt werden (Abb. 20).

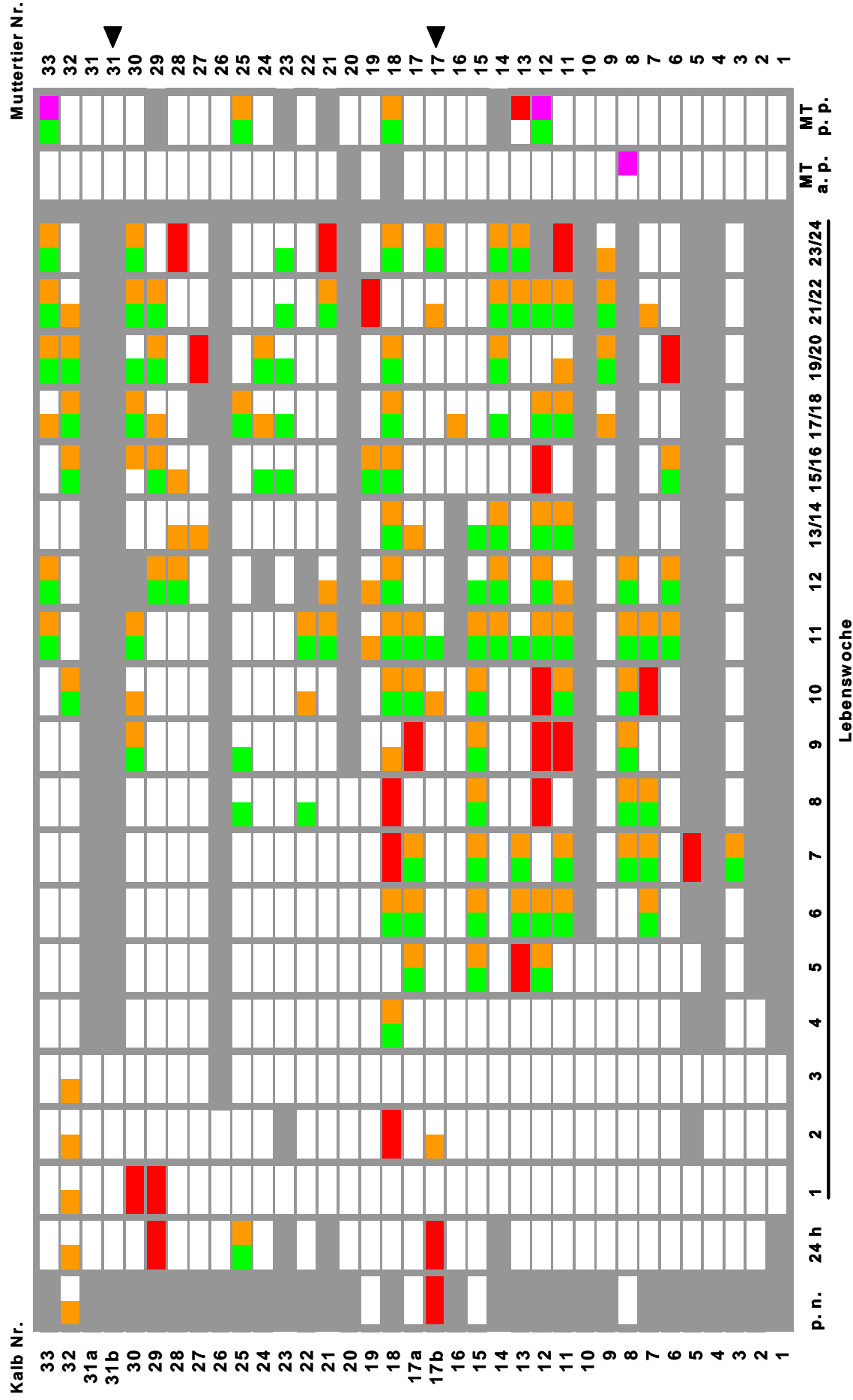


Abb. 20: Ergebnisse der *stx2*-Typisierungs-PCRs in Kotproben von Kälbern und Muttertieren

Bei *stx2*-positiven Kotproben (Abb. 17) ist der ermittelte *stx2*-Subtyp farblich gekennzeichnet: **orange**: *stx2*, **grün**: *stx2c*, **violett**: *stx2d*, **rot**: *stx2*-Variante nicht typisierbar; **p.n.**: post natum (erste Probenentnahme); **24 h**: Probe innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und nach Kolostrumaufnahme; **MT a.p.**: Kotprobe des Muttertieres vor der Abkalbung; **MT p.p.**: Probe des Muttertieres unmittelbar nach der Abkalbung; **◄**: Muttertiere #17 u. #31 sind in der Legende doppelt aufgeführt, da ihnen je 2 Kälber zugeordnet werden (17a/b bzw. 31a/b)

Eine detaillierte Auflistung über die Anzahl untersuchter Kälberkotproben sowie die Ergebnisse des *stx*-Nachweises in den einzelnen Kalendermonaten findet sich in Tab. 21.

Tab. 21: Anzahl *stx*-positiver und -negativer Kälberkotproben in den einzelnen Kalendermonaten

Monat	Anzahl Proben	<i>stx</i> -negativ	%	<i>stx</i> -positiv	%	<i>stx1</i>	%	%Pos	<i>stx2</i>	%	%Pos	<i>stx1</i> / <i>stx2</i>	%	%Pos
Jan	47	32	68,1	15	31,9	3	6,4	20,0	10	21,3	66,7	2	4,3	13,3
Feb	38	33	86,8	5	13,2	0	0,0	0,0	5	13,2	100,0	0	0,0	0,0
März	50	32	64,0	18	36,0	2	4,0	11,1	5	10,0	27,8	11	22,0	61,1
Apr	53	37	69,8	16	30,2	0	0,0	0,0	7	13,2	43,8	9	17,0	56,3
Mai	58	49	84,5	9	15,5	1	1,7	11,1	5	8,6	55,6	3	5,2	33,3
Jun	43	23	53,5	20	46,5	6	14,0	30,0	3	7,0	15,0	11	25,6	55,0
Juli	33	16	48,5	17	51,5	3	9,1	17,6	4	12,1	23,5	10	30,3	58,8
Aug	45	17	37,8	28	62,2	1	2,2	3,6	11	24,4	39,3	16	35,6	57,1
Sep	41	19	46,3	22	53,7	7	17,1	31,8	3	7,3	13,6	12	29,3	54,5
Okt	35	19	54,3	16	45,7	4	11,4	25,0	5	14,3	31,3	7	20,0	43,8
Nov	60	40	66,7	20	33,3	3	5,0	15,0	11	18,3	55,0	6	10,0	30,0
Dez	40	31	77,5	9	22,5	3	7,5	33,3	5	12,5	55,6	1	2,5	11,1
gesamt	543	348	64,1	195	35,9	33	6,1	16,9	74	13,6	37,9	88	16,2	45,1

Erläuterungen: für jeden Kalendermonat ist die Anzahl der untersuchten Proben, die Anzahl und der prozentuale Anteil *stx*-positiver und *stx*-negativer Kotproben dargestellt. Weiterhin ist die Anzahl, der prozentuale Anteil an der Probenzahl des Monats sowie der prozentuale Anteil an den *stx*-positiven Proben für *stx1/stx2*- bzw. *stx1*- und *stx2*-positive Proben angegeben.

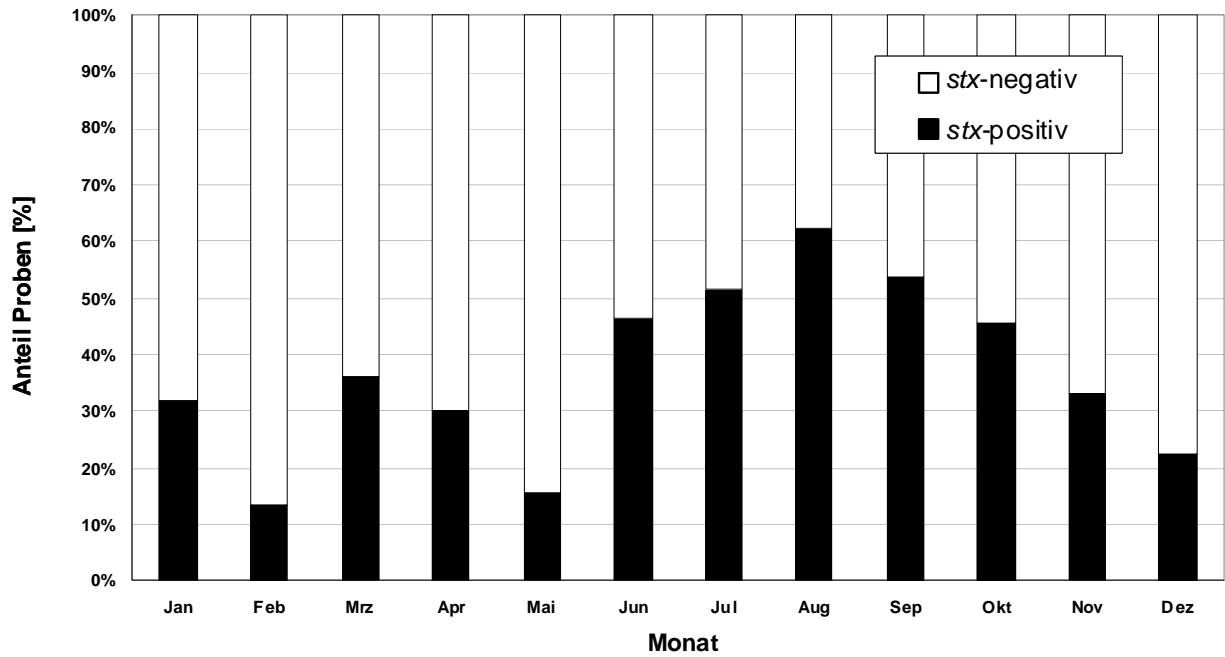
Insgesamt wurden 543 Kälberkotproben untersucht. In 195 (35,9 %) dieser Proben konnten *Stx*-Gene nachgewiesen werden. Dabei fanden sich Gene ausschließlich für *Stx1* in insgesamt 33 (6,1 %), für *Stx2* in 74 (13,6 %) sowie Gene beider Toxintypen in 88 (16,2 %) Kälberkotproben (Tab. 21). Festzuhalten ist, dass der prozentuale Anteil *stx*-positiver Kotproben jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen war. In den Sommermonaten Juli, August und September konnten die meisten *stx*-positiven Proben (gemessen an der Gesamtprobenzahl des Monats) verzeichnet werden. Im Winterhalbjahr dagegen fiel der Anteil *stx*-positiver Proben wieder deutlich ab (Abb. 21).

Auch der Anteil der *stx1*-, *stx2*- sowie *stx1/stx2*-positiven Proben bezogen auf die Zahl aller *stx*-positiven Kotproben eines Monats schwankte im Jahresverlauf (Abb. 21). So betrug er beispielsweise für *stx2*-positive Proben im Monat Februar 100 %, im September dagegen nur 13,6 %.

Bei den 60 untersuchten Kotproben von Muttertieren konnten Stx-Gene insgesamt 12 (20,0 %) mal nachgewiesen werden. Während Stx-Gene in den außerhalb der Abkalbungszeit entnommenen Proben in nur 9,6 % der Fälle nachweisbar waren, fanden sie sich bei den unmittelbar nach der Geburt entnommenen Proben in 31,0 % aller Fälle. Im Gegensatz zu den Kälberkotproben wurden Gene für Stx1 bei den Muttertieren häufiger nachgewiesen als Gene für Stx2. Bei den Proben außerhalb der Abkalbung betrug der Anteil *stx1*-positiver Proben 6,5 % gegenüber 3,2 % *stx2*-positiven Proben. Unmittelbar nach der Kalbung betrug ihr Anteil 20,7 % gegenüber 17,2 %.

Die Kotproben der Muttertiere nach der Abkalbung wiesen hinsichtlich der detektierten *stx*-Varianten in nur zwei Fällen eine Übereinstimmung mit den Kotproben ihrer neugeborenen Kälber auf.

A



B

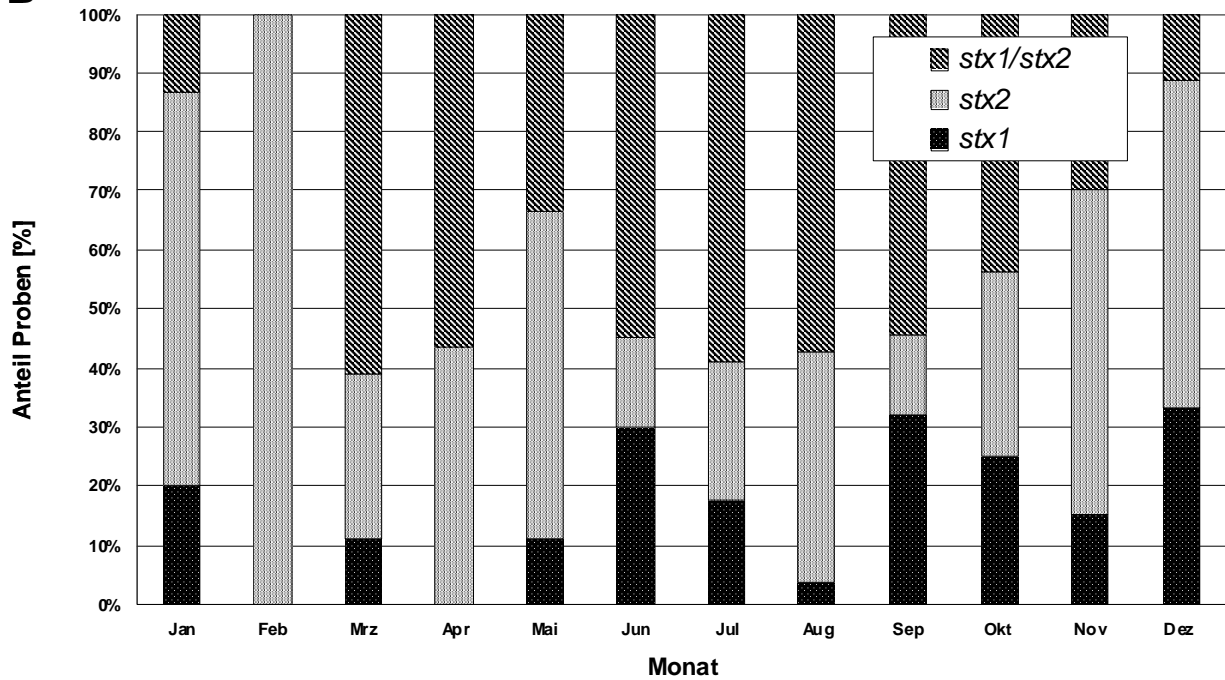


Abb. 21: Jahreszeitliche Verteilung *stx*-positiver Kälberkotproben

Jahreszeitliche Verteilung *stx*-positiver und -negativer Kälberkotproben (A), Jahreszeitliche Verteilung *stx1*-, *stx2*- sowie *stx1/stx2*-positiver Proben an den *stx*-positiven Kälberkotproben (B).

2.2 Nachweis von Stx im Kot

Es wurden insgesamt 76 *stx*-positive Kotproben, darunter 6 Kälberkotproben aus dem Probenpool sowie alle 70 Kotproben, die für die Isolation von STEC-Stämmen herangezogen wurden (Kapitel 3; Abb. 22) im Novitec® Verotoxin-ELISA auf das Vorhandensein von freiem Stx1 und Stx2 getestet. In 3 der untersuchten Kotproben (positiv in der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR, Kalb Nr. 32, 1., 2. und 3. Lebenswoche) konnte eine OD von $> 0,150$ nachgewiesen werden, was laut Angaben des Herstellers das Vorhandensein von Stx-Antigenen in der untersuchten Probe anzeigt. In allen weiteren untersuchten Kotproben lag die OD bei $< 0,150$.

3 Isolierung und Charakterisierung von bovinen STEC-Stämmen

Um genauere Informationen über die im Untersuchungsbestand vorhandene STEC-Population zu erhalten, wurden STEC-Stämme aus repräsentativen Kotproben isoliert und hinsichtlich ihrer Virulenz- und Adhäsionseigenschaften charakterisiert.

3.1 Typisierung der isolierten Stämme

Insgesamt wurden 70 verschiedene Kotproben von 14 Kälbern und 3 Muttertieren, die zuvor in der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR ein positives Ergebnis für *stx1*, *stx2* oder beide Gene aufwiesen, für die Isolation von STEC-Stämmen verwendet. In Abb. 22 sind die für die Isolation der Stämme herangezogenen Kotproben mit Symbolen gekennzeichnet. Um möglichst viele Isolate mit unterschiedlichen Eigenschaften zu erhalten, wurden bei der Auswahl Kotproben von Kälbern berücksichtigt, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihres Lebens und mehrfach positiv auf das Vorkommen verschiedener Stx-Gene getestet worden waren und möglichst unterschiedliche *stx*-Profile in diesen Kotproben aufwiesen. Zusätzlich wurden einige postpartale Kotproben von Muttertieren dieser Kälber verwendet.

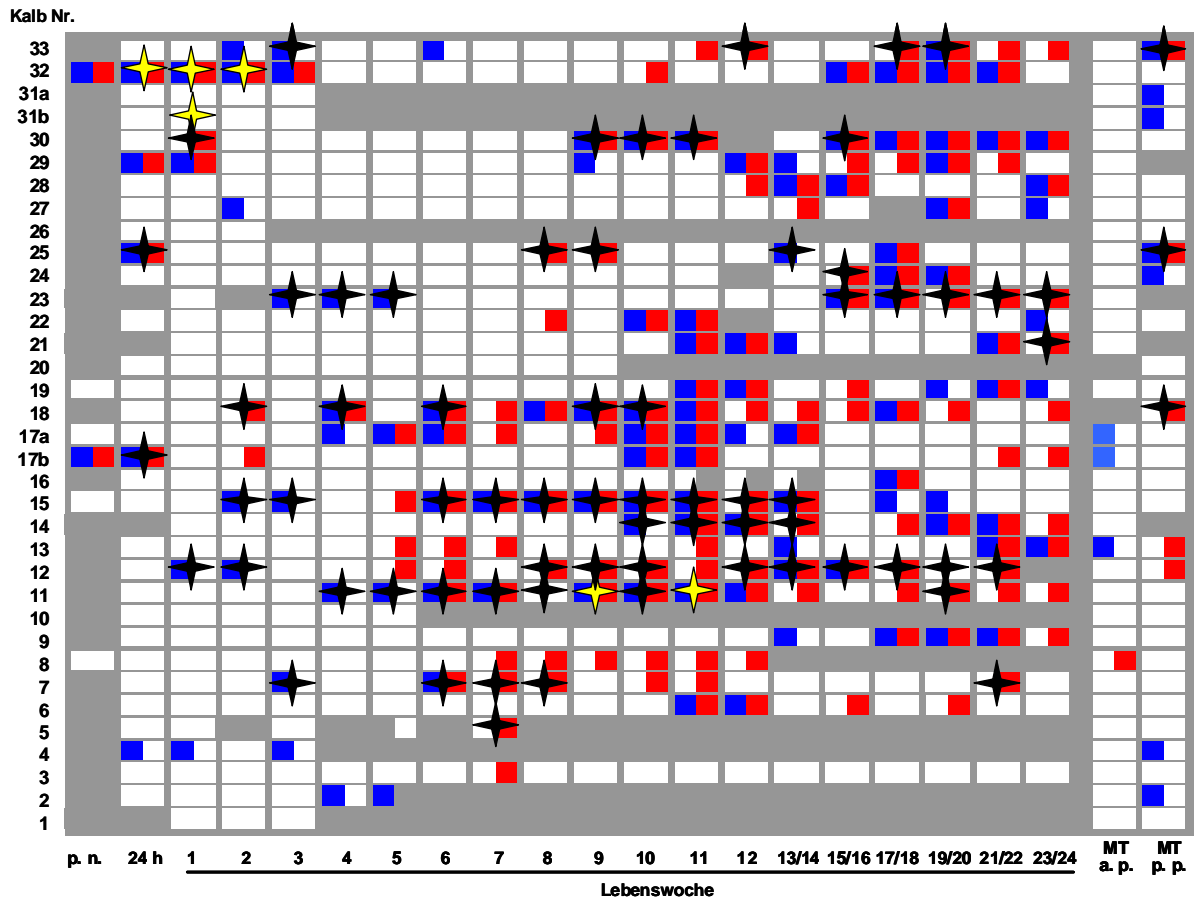


Abb. 22: Für die Isolation von STEC-Stämmen herangezogene Kotproben

Die für die Isolation verwendete Kotproben sind gekennzeichnet (schwarze Sterne); zusätzlich im ELISA auf das Vorhandensein von Stx getestete Kotproben sind gesondert gekennzeichnet (gelbe Sterne); **p.n.:** post natum (erste Probenentnahme); **24 h:** Probe innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und nach Kolostrumaufnahme; **MT a.p.:** Kotprobe des Muttertieres vor der Abkalbung; **MT p.p.:** Probe des Muttertieres unmittelbar nach der Abkalbung; Nachweis von stx1 = blau, von stx2 = rot (siehe Abb. 17).

Aus den Ausstrichen der Kotproben wurden insgesamt 700 Einzelkolonien entnommen, subkultiviert und zunächst in der *stx1/stx2*-Multiplex-PCR auf das Vorhandensein von Stx-Genen untersucht. Aufgrund dieser Untersuchung konnten 65 Isolate als STEC identifiziert werden. Dabei konnten Stämme aus Kotproben von neun unterschiedlichen Kälbern, jedoch nicht aus Kotproben von Muttertieren isoliert werden. Die Ergebnisse der Virulenzprofilanalyse mittels PCR, der *in vitro* Stx-Bildung und des Wachstums auf Selektivagarplatten sind in der nachfolgenden Tabelle für alle Isolate aufgelistet (Tab. 22).

Tab. 22: Eigenschaften der isolierten STEC-Stämme

Ifd. Nr.	Probe	Kalb #	Alter	Stamm	Multiplex stx1/stx2	stx2 Typisierung	in vitro Stx- Bildung	SMAC	CT-SMAC	Multiplex-PCR			
										stx1	stx2	eae	ehxA
1	JF4	25	14LW	JF43	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
2				JF45	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
3				JF47	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
4				JF48	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
5				JF49	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		ehxA
6	JF8	11	6LW	JF83	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
7	JF9	11	7LW	JF96	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
8				JF99	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
9				JF910	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
10	JF12	11	20LW	JF121w	stx2	stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
11				JF126	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
12				JF129	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
13				JF192	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
14	JF21	15	3LW	JF215	stx2	(stx2)/stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
15	JF23	15	9LW	JF233	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
16	JF25	15	11LW	JF2510	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Wachstum		stx2		
17				JF251	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Hemmung	stx1	stx2	eee	ehxA
18				JF281	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
19	JF28	23	3LW	JF282	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
20	JF29	23	4LW	JF291	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
21				JF292	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
22				JF293	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
23				JF294	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
24				JF295	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
25				JF296	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
26				JF297	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
27				JF298	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
28				JF299	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
29				JF2910	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
30				JF311	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
31	JF31	23	16LW	JF312	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
32				JF313	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
33				JF314	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
34				JF315	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
35				JF316	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
36				JF317	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
37				JF318	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
38				JF319	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
39				JF3110	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
40				JF321	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
41	JF32	23	18LW	JF323	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
42				JF325r	stx2	n.t.	neg	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
43				JF325w	stx2	stx2c	pos	Sorbitid -	Hemmung		stx2		
44				JF326	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
45				JF327	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
46				JF328	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
47				JF3210	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		
48				JF382	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
49	JF38	33	17LW	JF385	stx1 stx2	stx2	pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1	stx2	eee	ehxA
50	JF42	18	6LW	JF42-3	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
51	JF46	30	1LW	JF46-10	stx1		pos	Sorbitid +	Hemmung	stx1		eee	ehxA
52	JF50	30	16LW	JF50-3	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
53				JF50-4	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
54				JF50-6	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
55				JF50-7	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
56	JF51	14	10LW	JF51-5	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
57				JF51-10	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
58	JF54	14	14LW	JF54-1	stx2	(stx2)/stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
59				JF54-5	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
60				JF54-6	stx2	stx2	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
61				JF54-8	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
62				JF54-9	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	Hemmung		stx2		(ehxA)
63				JF54-10	stx2	stx2/stx2c	pos	Sorbitid -	Wachstum		stx2	eee	ehxA
64	JF64	12	2LW	JF649	stx1		pos	Sorbitid +	Wachstum	stx1		eee	ehxA
65	JF70	12	22LW	JF708	stx2	stx2c	pos	Sorbitid +	pat. Hemm.		stx2		

Erläuterungen: Ifd. Nr.: laufende Nummer der Isolate; **Probe:** Bezeichnung der Kotprobe welcher das Isolat entstammt; **Stamm:** Bezeichnung des Isolates; **stx2-Typisierung:** Ergebnis der stx2-Typisierungs-PCRs; **in vitro Stx-Bildung:** Ergebnis des Vero-ZT; **SMAC:** Sorbitol-MacConkey-Agar, Sorbitol+ oder Sorbitol- Kolonien bei Anzucht auf dem Agar; **CT-SMAC:** Cefexim-Tellurit-SMAC, Wachstum, Hemmung oder partielle Hemmung der Stämme bei Anzucht auf dem Agar; **n.t.:** stx2-Variante nicht typisierbar.

3.1.1 Charakterisierung des Makrorestriktionsmusters via PFGE-Analyse

Um die Klonalität der STEC-Stämme zu bestimmen, wurden die Isolate einer Makrorestriktionsmuster-Analyse mittels CHEF-PAGE unterzogen. Abb. 23 zeigt beispielhaft das Ergebnis für 11 von 65 untersuchten Isolaten.

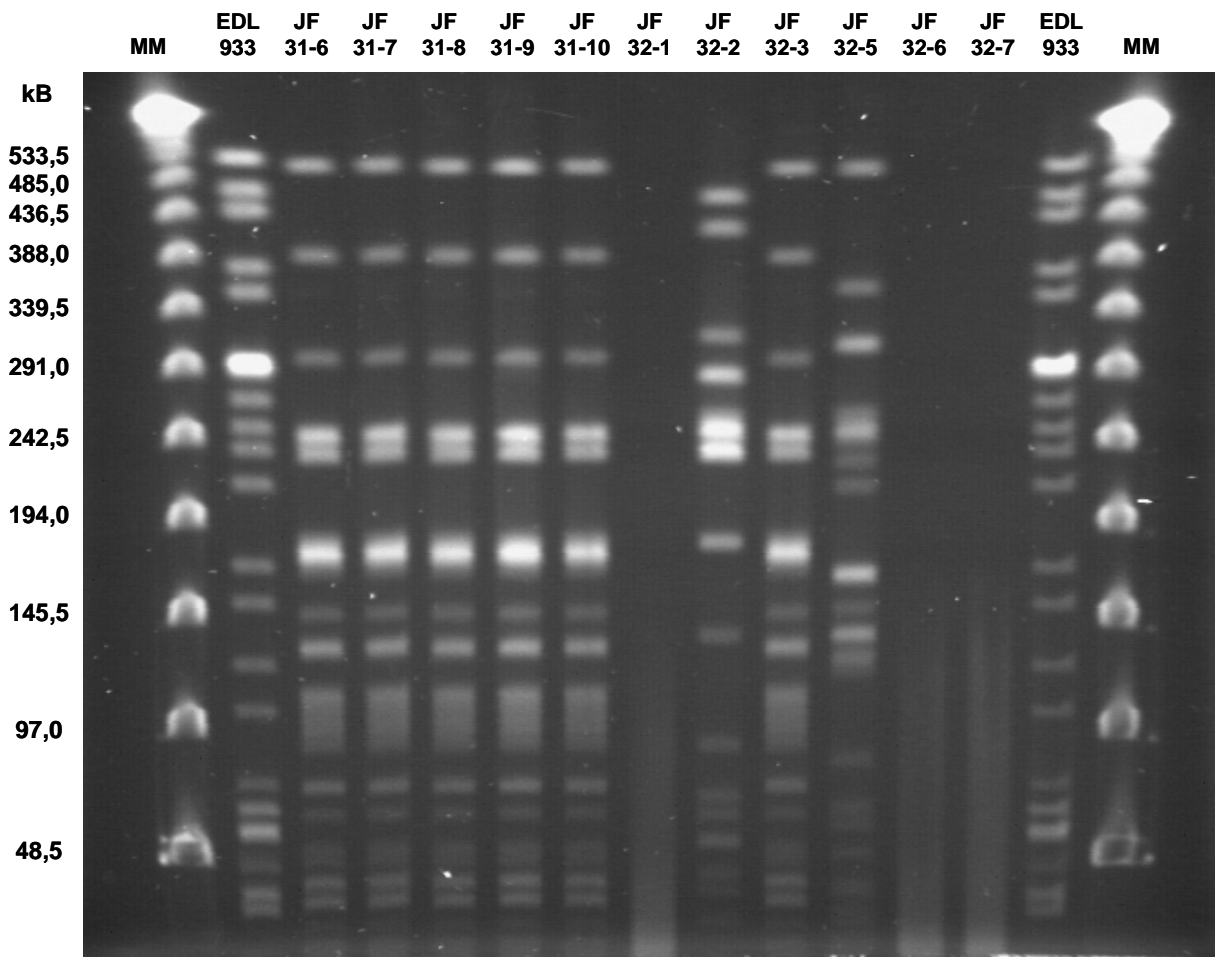


Abb. 23: Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) von Kontrollstamm EDL933 sowie 11 STEC-Isolaten

Elektropherogramm eines 1 %-igen Agarosegels nach Ethidiumbromidfärbung; die Stämme JF 31-6 bis JF 31-10 und JF 32-3 weisen gleiche Makrorestriktionsmuster auf, Restriktionsmuster der Stämme JF 32-1, JF 32-6 und JF 32-7 aufgrund von Autodigestion der DNA nicht zu beurteilen, Stämme JF 32-2 und JF 32-5 zeigen unterschiedliche Restriktionsmuster; **MM**: Molekularmassenstandard Lambda Ladder PFG Marker; **kB**: kilo Basen.

Aufgrund der Analyse der Restriktionsmuster der untersuchten STEC-Isolate wurden die Stämme bei entsprechend gleichem Bandenmuster in Gruppen eingeteilt (I bis X). Dabei konnten 10 Gruppen gebildet werden, denen bis zu 14 Isolate zuzuordnen waren. 5 Isolate konnten aufgrund ihres Makrorestriktionsmusters keiner der 10 Gruppen zugeordnet werden. Ihr individuelles Bandenmuster war selbst nach veränderten Laufbedingungen aufgrund von

Autolyse der DNA nicht auswertbar (Tab. 23). In ihrer Gesamtheit wiesen die Isolate 9 unterschiedliche Virulenzgen-Profile auf.

Tab. 23: Ergebnisse der Restriktionsmusteranalyse der STEC-Isolate

PFGE-Gruppe	Virulenzgen-Profil				Anzahl Stämme
I	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i> [Isolat JF 31-1: <i>eae_{zeta}</i>]	<i>ehxA</i>	14
II	<i>stx1</i>		<i>eae</i> [Isolat JF 29-1: <i>eae_{beta1}</i>]	<i>ehxA</i>	12
III		<i>stx2 + stx2c</i>	<i>eae</i> [Isolat JF 50-3: <i>eae_{beta1}</i>]	<i>ehxA</i>	10
IV	<i>stx1</i>		<i>eae</i> [Isolat JF 9-6: <i>eae_{epsilon1}</i>]	<i>ehxA</i>	4
V	<i>stx1</i>		<i>eae</i> [Isolat JF 4-3: <i>eae_{zeta}</i>]	<i>ehxA</i>	4
VI		<i>stx2c</i>			5
VII		<i>stx2c</i>		<i>ehxA</i>	7
VIII		<i>stx2c</i>			2
IX	<i>stx1</i>		<i>eae</i> [Isolat JF 19-2: <i>eae_{epsilon1}</i>]	<i>ehxA</i>	1
X	<i>stx1</i>		<i>eae</i> [Isolat JF 46-10: <i>eae_{epsilon1}</i>]	<i>ehxA</i>	1
		<i>stx2c</i>		<i>ehxA</i>	1
		<i>stx2c</i>			1
		<i>stx2 + stx2c</i>			1
		<i>stx2c</i>		<i>ehxA</i>	1
		<i>stx2</i> (n.t.)			1

Erläuterungen: 60 Isolate wurden aufgrund ihres Makrorestriktionsmusters in die PFGE-Gruppen I bis X eingeteilt. Die restlichen 5 Isolate konnten keiner Gruppe zugeordnet werden, ihre Virulenzprofile sind deshalb ohne Gruppennummern aufgeführt; **n.t.:** *stx2*-Variante nicht typisierbar.

3.1.2 Bestimmung des Intimin-Subtyps

Entsprechend der Einordnung der Stämme in die genannten Gruppen, wurde je ein repräsentativer Stamm der *eae*-postiven Gruppen I-V, IX und X im Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde der JLU Gießen auf den Intimin-Subtyp hin untersucht. Die ermittelten Allele der Intimingene der untersuchten Stämme sind in Tab. 23 für die jeweilige PFGE-Gruppe vermerkt.

3.2 Bindungsversuche im Zellkulturmodell

Um zu klären, ob die STEC-Isolate *in vitro* unter Ausbildung von A/E-Läsionen an epitheliale Zellen adhären können, und ob Stx während dieser Anheftung gebildet wird, wurden

Adhäsionsversuche mit etablierten Zelllinien und primären bovinen Kolonkryptenzellen durchgeführt.

3.2.1 Bindungsversuche mit HEp2(Clone2b)-Zellen

3.2.1.1 FAS-Test

Der Test wurde mit 7 STEC-Isolaten durchgeführt. Dabei wurden je ein Vertreter der *eae*-positiven PFGE-Gruppen I bis V sowie zwei Vertreter aus *eae*-negativen PFGE-Gruppen ausgewählt. Als Kontrollen dienten außerdem der EPEC-Stamm 2348/69, der EHEC-Stamm EDL933 sowie der *E. coli*-Stamm C600 (Tab. 24). Eine stark positive Reaktion im FAS-Test erreichten nur die Ansätze, welche mit dem EPEC-Kontrollstamm E2348/69 inkubiert wurden, keine Signale hingegen zeigten sich bei der Inkubation mit dem Stamm C600 sowie in den Ansätzen ohne Bakterien (MK). Von den überprüften bovinen STEC-Isolaten konnte eine schwach positive Reaktion nur bei dem Stamm JF 29-1 nachgewiesen werden (Tab. 24, Abb. 24).

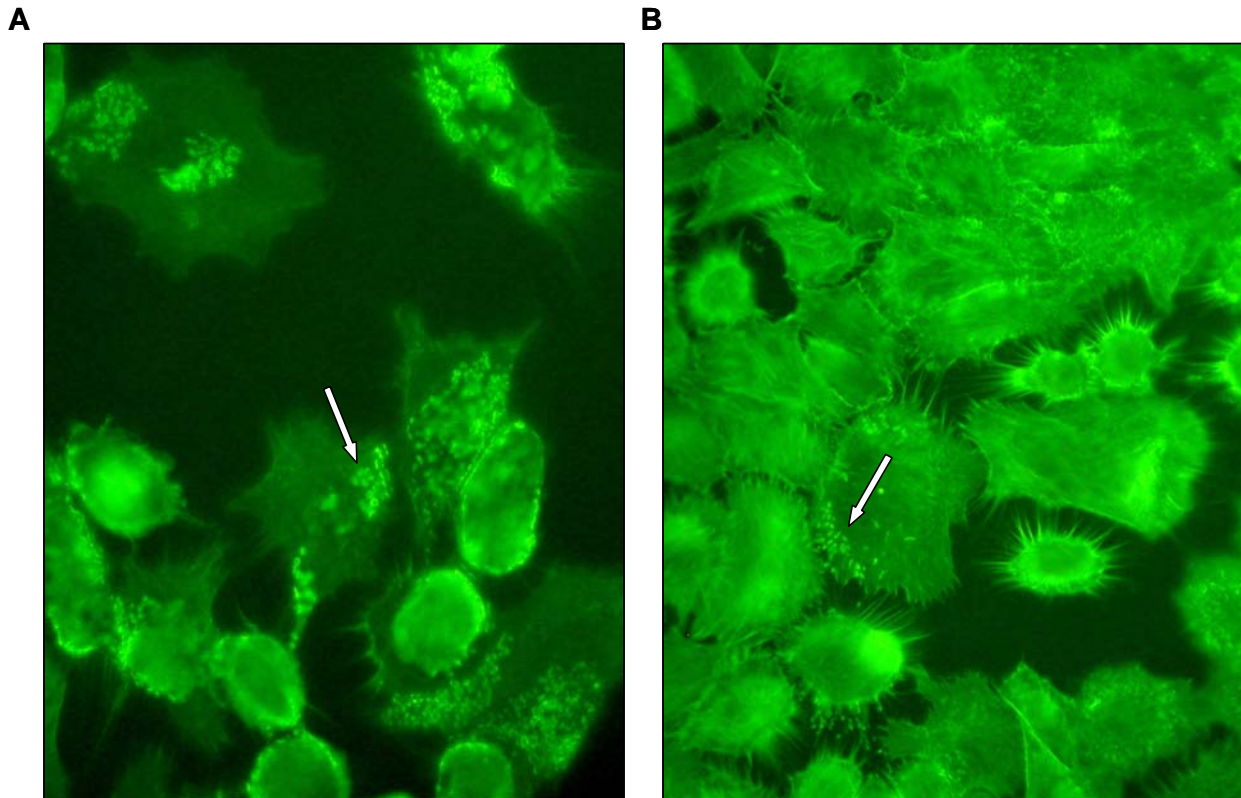


Abb. 24: FAS-Test mit HEp2(Clone2b)-Zellen, positive Reaktion

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, 400-fache Vergrößerung; HEp2(Clone2b)-Zellen, FITC-Phalloidin-Färbung; EPEC-Stamm E2348/69: stark positive Reaktion mit zahlreichen intrazellulären Aktinkumulationen unterhalb der bakteriellen Anheftungsstellen in $> \frac{2}{3}$ aller Zellen (A); schwach positive Reaktion (Signale in $< \frac{1}{3}$ aller Zellen) bei STEC-Stamm JF 29-1 (B). Pfeile signalisieren positive FAS-Signale.

3.2.1.2 Giemsa-Test

Der HEp2-Adhäsionstest mit anschließender Giemsa-Färbung wurde parallel zum FAS-Test mit den genannten *E. coli*-Stämmen durchgeführt. In diesem Test konnte eine starke Anheftung des EPEC-Stammes E2348/69 und eine mittelstarke Anheftung des EHEC-Kontrollstammes EDL933 beobachtet werden. Beide Stämme wiesen eine typische lokale Adhäsionsform (LA) auf. Bakterien des Stammes C600 hafteten sich nur vereinzelt an die Zellen an. Bei allen überprüften bovinen STEC-Isolaten konnte eine Adhäsion an HEp2-Zellen mittels Giemsa-Färbung nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Stärke der Adhäsion sowie im Anheftungsmuster. Bei 3 Stämmen konnte eine starke, bei zwei Stämmen eine mittelstarke und bei zwei Stämmen eine schwache Adhäsion nachgewiesen werden (Abb. 25). Bezüglich des Anheftungsmusters unterschieden sich die getesteten Stämme ebenfalls. Mit Ausnahme des Isolates JF 32-7, welches eine aggregative Adhäsion aufwies, zeigten alle STEC Isolate eine Adhäsion vom Typ LA (Tab. 24).

Tab. 24: Bindungsversuche mit HEp2(Clone2b)-Zellen; Adhäsionstest

Stamm	PFGE-Gruppe	<i>eae</i> -Typ	Adhäsion			
			FAS-Test		Giemsa-Test	
			Reaktion ¹⁾	Intensität ²⁾	Muster ³⁾	Intensität ²⁾
E2348/69	-	<i>eae</i> _{alpha}	positiv	stark	LA	stark
EDL 933	-	<i>eae</i> _{gamma}	negativ	-	LA	mittel
JF 31-1	I	<i>eae</i> _{zeta}	negativ	-	LA	mittel
JF 29-1	II	<i>eae</i> _{beta1}	positiv	schwach	LA	stark
JF 50-3	III	<i>eae</i> _{beta1}	negativ	-	LA	mittel
JF 9-9	IV	[Isolat JF 9-6: <i>eae</i> _{epsilon1}]	negativ	-	LA	stark
JF 51-5	V	[Isolat JF 4-3: <i>eae</i> _{zeta}]	negativ	-	LA	schwach
JF 4-5	VIII	<i>eae</i> -neg.	negativ	-	LA	schwach
JF 32-7	VII	<i>eae</i> -neg.	negativ	-	AA	stark
C600	-	<i>eae</i> -neg.	negativ	-	-	-
MK	-	-	negativ	-	-	-

Erläuterungen: 1): ein Isolat wurde als positiv eingestuft, wenn pro Zelle mindestens 10 Signale vorhanden waren, unabhängig von der Zahl der betroffenen Zellen; **2):** Anteil der infizierten Zellen, schwach ($< \frac{1}{3}$ der Zellen), mittel ($\geq \frac{1}{3}$ und $< \frac{2}{3}$), stark ($\geq \frac{2}{3}$ der Zellen); **3):** ein Isolat wurde als adhärent eingestuft, wenn mindestens 10 Bakterien pro Zelle anhafteten, unabhängig von der Zahl der betroffenen Zellen, Beurteilung der Adhäsionsform: lokale Adhäsion (LA); aggregative Adhäsion (AA); **MK:** Mediumkontrolle (Ansatz ohne Bakterienstamm).

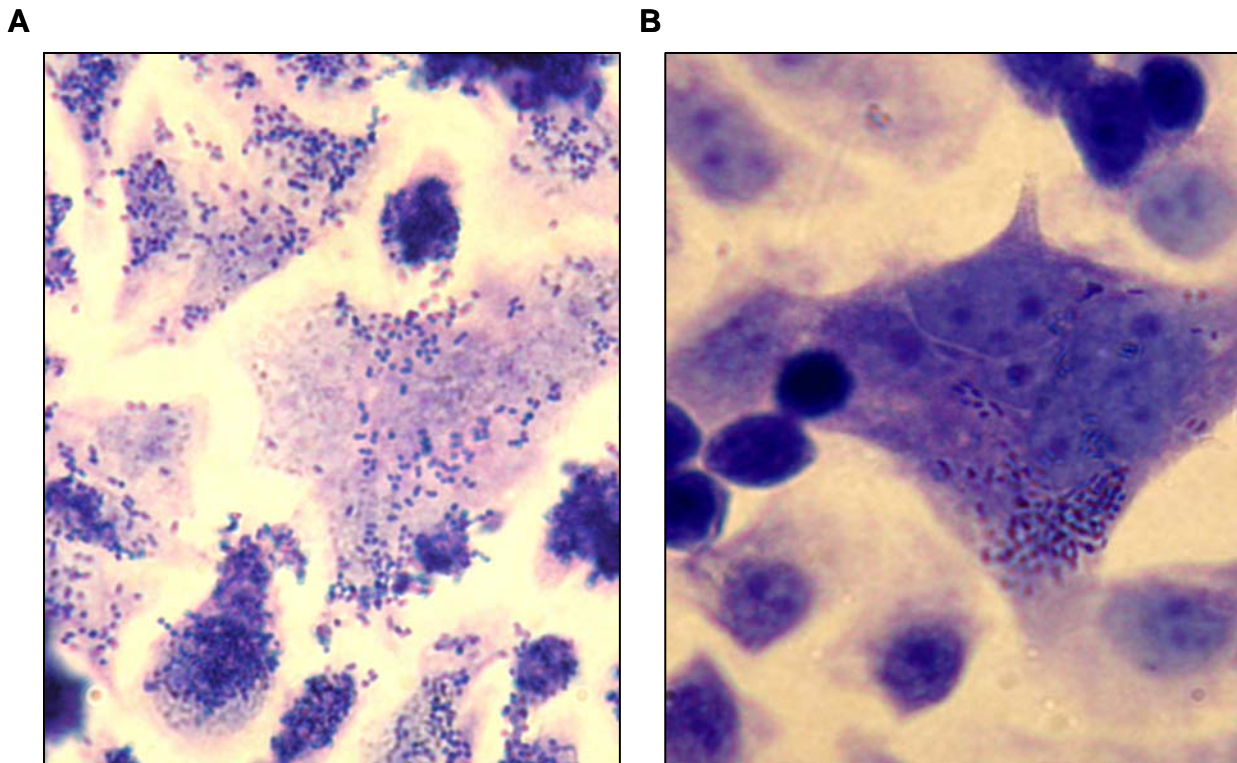


Abb. 25: Giemsa-Test mit HEp2(Clone2b)-Zellen, adherente bovine STEC-Stämme

Lichtmikroskopische Aufnahme, 400-fache Vergrößerung; Stamm JF 29-1: starke, lokale Adhäsion (A). Stamm JF 51-5: schwache, lokale Adhäsion (B).

3.2.2 Bindungsversuche mit bovinen Kolonkryptenzellen

3.2.2.1 FAS-Test

Der FAS-Test mit bovinen Kolonkryptenzellen wurde mit Ausnahme des Stammes JF 32-7 mit den gleichen Isolaten wie im Falle von HEp2-Zellen durchgeführt (Tab. 25). Auf bovinen Epithelzellen konnte eine typische Reorganisation von intrazellulären Aktinfilamenten bei Inkubation mit dem EPEC-Referenzstamm E2348/69 nachgewiesen werden, welcher eine stark positive Reaktion hervorrief (Abb. 26). Bei Inkubation mit dem Stamm C600, sowie im Ansatz mit bakterienfreiem Medium (MK) konnten dagegen keine Signale detektiert werden. Eine positive Reaktion konnte bis auf eine Ausnahme bei keinem bovinen STEC-Stamm und auch nicht bei dem EHEC-Kontrollstamm EDL933 nachgewiesen werden. Lediglich das bovine STEC-Isolat JF 9-9 zeigte ein schwach positives Ergebnis in einem der beiden Versuchsdurchläufe (Abb. 26).

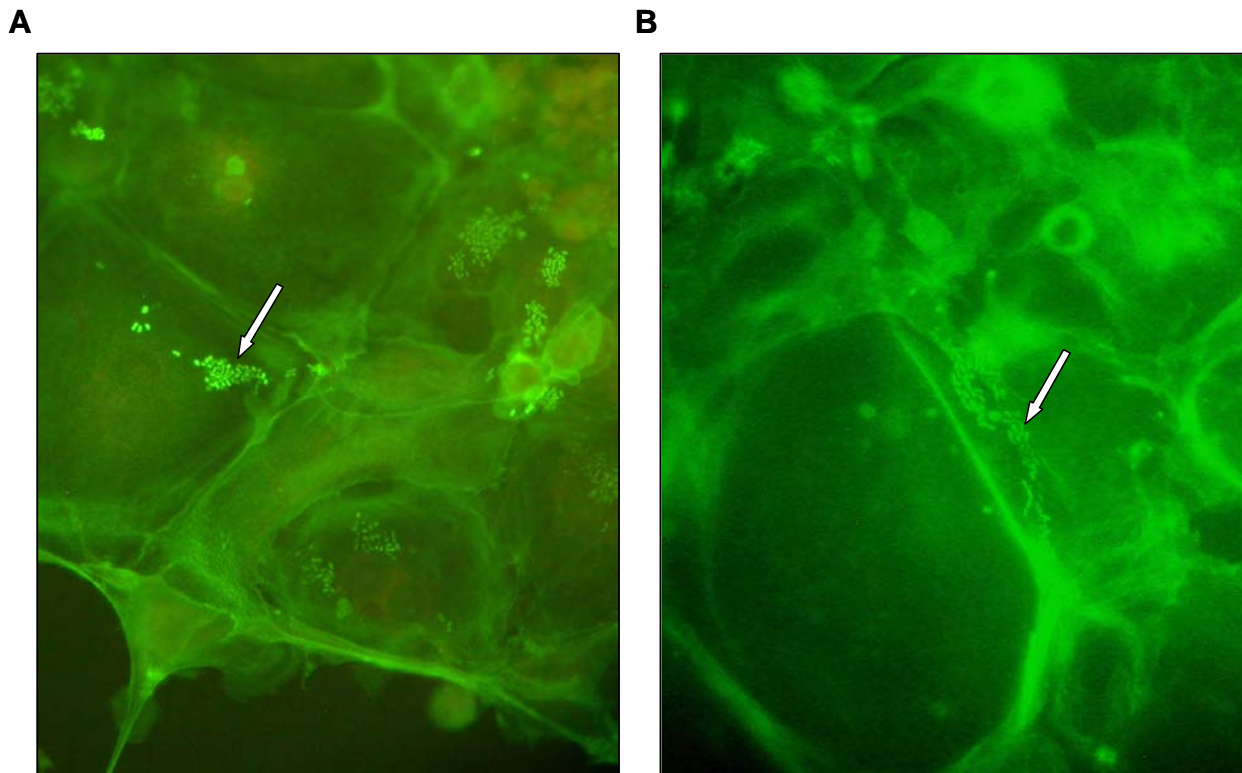


Abb. 26: FAS-Test mit bovinen Kolonkryptenzellen, positive Reaktion

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen; 400-fache Vergrößerung; bovine Kolonkryptenzellen, FITC-Phalloidin-Färbung; EPEC-Stamm E2348/69: stark positive Reaktion mit zahlreichen intrazellulären Aktinkumulationen unterhalb der bakteriellen Anheftungsstellen in $> \frac{2}{3}$ aller Zellen (A); STEC-Stamm JF 9-9: schwach positive Reaktion (Signale in $< \frac{1}{3}$ aller Zellen) (B).

3.2.2.2 Giemsa-Adhäsionstest

Sowohl der EPEC-Kontrollstamm E2348/69 als auch der EHEC-Stamm EDL933 zeigten im Giemsa-Test adhärente Eigenschaften, welche mit denen auf HEp2-Zellen vergleichbar waren. Die Adhäsion des EHEC EDL933 verlief jedoch schwächer als auf HEp2-Zellen. Bei allen überprüften bovinen STEC-Isolaten konnte eine Adhäsion der Bakterien an bovine Kolonkryptenzellen festgestellt werden. Wie bei den Bindungsversuchen mit HEp2-Zellen waren jedoch unterschiedliche Adhäsionsintensitäten und -muster erkennbar (Tab. 25). Mit Ausnahme des Stammes JF 51-1 war die Intensität der Adhäsion gleich oder schwächer als auf HEp2-Zellen. Zwei Isolate wiesen den lokalen Adhäsionstyp (LA) auf. Bei drei Isolaten war keine eindeutige Unterscheidung zwischen lokaler und aggregativer Adhäsion möglich (AA-LA), ein Isolat wies eine aggregative Adhäsion (AA) auf (Abb. 27). Bei dem Kontrollstamm C600 konnte keine Adhäsion an bovine Kolonkryptenzellen nachgewiesen werden.

Tab. 25: Bindungsversuche mit bovinen Kolonkryptenzellen, Adhäsionstest

Stamm	PFGE-Gruppe	<i>eae</i> -Typ	Adhäsion			
			FAS-Test		Giemsa-Test	
			Reaktion ¹⁾	Intensität ²⁾	Muster ³⁾	Intensität ²⁾
E2348/69	-	<i>eae</i> _{alpha}	positiv	stark	LA	stark
EDL 933	-	<i>eae</i> _{gamma}	negativ	-	LA	schwach
JF 31-1	I	<i>eae</i> _{zeta}	negativ	-	LA	schwach
JF 29-1	II	<i>eae</i> _{beta1}	negativ	-	LA	schwach
JF 50-3	III	<i>eae</i> _{beta1}	negativ	-	AA	schwach
JF 9-9	IV	[Isolat JF 9-6: <i>eae</i> _{epsilon1}]	positiv ⁵⁾	schwach	AA-LA	stark
JF 51-5	V	[Isolat JF 4-3: <i>eae</i> _{zeta}]	negativ	-	AA-LA	mittel
JF 4-5 ⁴⁾	VIII	<i>eae</i> -neg.	negativ	-	AA-LA	schwach
C600	-	<i>eae</i> -neg.	negativ	-	-	-
MK	-		negativ	-	-	-

Erläuterungen: 1), 2), 3): Beurteilung der Reaktion/Intensität siehe Tab. 24; 4): Stamm JF 4-5 wurde nur in einem der beiden Versuche getestet; 5): positives Ergebnis nur bei einem der beiden Versuchsdurchläufe **MK:** Mediumkontrolle (Ansatz ohne Bakterienstamm).

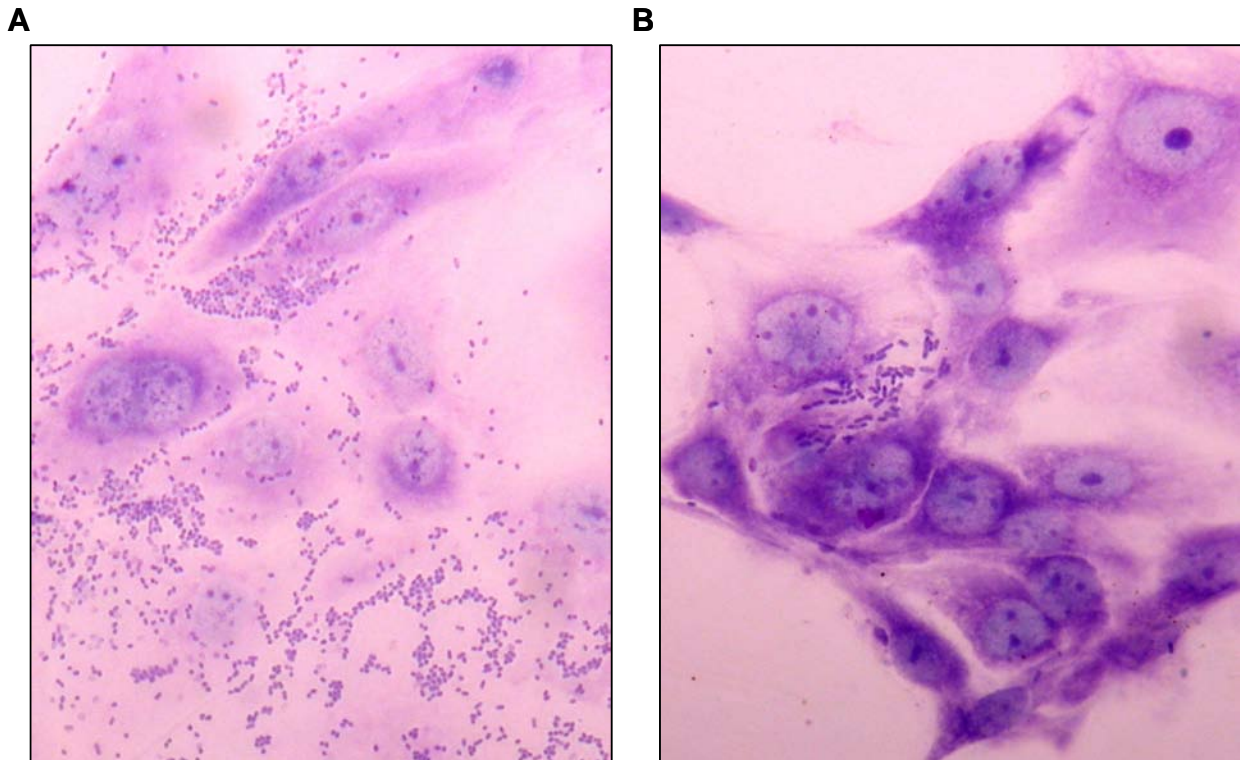


Abb. 27: Giemsa-Test mit bovinen Kolonkryptenzellen, adhärenste bovine STEC-Stämme

Lichtmikroskopische Aufnahme, 400-fache Vergrößerung; Stamm JF 9-9: starke, lokal-aggregative Adhäsion (A); Stamm JF 29-1: schwache, lokale Adhäsion (B).

3.2.2.3 Nachweis von Stx in Zellkulturüberständen

Die Zellkulturüberstände aus den Adhäsionsversuchen mit bovinen Kolonkryptenzellen wurden auf ihre zytotoxische Wirkung im Vero-ZT hin untersucht. In Tab. 26 ist die relative Zellaktivität (%) für alle drei Verdünnungsstufen der Überstände im Verozell-Zytotoxizitätstest angegeben.

Tab. 26: Vero-Zytotoxizität von Zellkulturüberständen boviner Kolonkryptenzellen aus Adhäsionstests

Stamm	PFGE-Gruppe	stx-Gen	Relative Zellaktivität (%)		
			1:3	1:30	1:300
E2348/69	-	-	88,41	97,08	97,59
EDL 933	-	<i>stx1, stx2</i>	-2,18	5,36	39,79
JF 31-1	I	<i>stx1, stx2</i>	-2,77	7,33	38,51
JF 29-1	II	<i>stx1</i>	1,42	35,10	83,99
JF 50-3	III	<i>stx2, stx2c</i>	27,13	54,60	84,53
JF 9-9	IV	<i>stx1</i>	-4,39	15,63	37,86
JF 51-5	V	<i>stx1</i>	-11,66	6,72	47,30
JF 4-5 ¹⁾	VIII	<i>stx2c</i>	34,75	65,47	81,04
C600	-	-	108,63	85,46	77,82
MK	-	-	107,29	90,19	104,13

Erläuterungen: Werte der Verdünnungsstufen stellen Mittelwerte aus insgesamt drei Bestimmungen der relativen Zellaktivität dar; **MK:** Mediumkontrolle (Ansatz ohne Bakterienstamm); **1):** Bei Stamm JF 4-5 Mittelwerte aus 2 Bestimmungen der rel. Zellaktivität gebildet.

Die Überstände aller Ansätze mit STEC-Stämmen führten zu einer deutlichen Reduktion der relativen Zellaktivität im Vero-ZT. Die Ansätze mit dem EPEC-Stamm E2348/69 oder dem K12-Stamm C600 führten dagegen zu keiner vergleichbaren Reduktion der relativen Zellaktivität gemessen an den Ansätzen ohne Bakterien (MK).

VII Diskussion

Shigatoxine (Stx) müssen aufgrund ihrer immunmodulierenden und -supprimierenden Wirkungen auf das adaptive Immunsystem bei Infektionen von Rindern mit Stx-bildenden *E. coli* (161, 162, 165, 260) als putative Kolonisationsfaktoren angesehen werden. Wenn Kälber bei der STEC-Erstinfektion vor der Wirkung der Toxine durch maternale oder eigene Stx-spezifische Antikörper nicht ausreichend geschützt sind, könnte die Immunmodulation die Entstehung persistenter Infektionen mit anhaltendem Ausscheidertum begünstigen. Im Rahmen der vorgelegten Studie sollte deshalb die Entwicklung der Stx-spezifischen Immunantwort bei neugeborenen Kälbern unter natürlichen Infektionsbedingungen überprüft werden.

Zunächst galt es Methoden zu etablieren, mit denen Stx-spezifische Antikörper zuverlässig quantifizierbar sind.

Der Verozell-Neutralisationstest (Vero-NT) beruht auf dem Zytotoxizitätstest nach Gentry und Dalrymple (82) und wurde bisher in allen Untersuchungen zum Vorkommen Stx-spezifischer Antikörper in Rinderseren und -kolostrum angewandt (101, 116, 220). Der Vero-NT zeichnet sich, neben der hohen Empfindlichkeit (1 verozytotoxische Dosis 50% entspricht 0,4-0,8 pg/ml gereinigten Shigatoxins (196)), vor allem durch den Nachweis von Antikörpern mit neutralisierenden Eigenschaften aus. Das System erfasst diejenigen Immunglobuline, die die Interaktion zwischen Stx und seinem zellulären Rezeptor Gb₃/CD77 oder die Internalisierung, Prozessierung und Translokation des Toxins beeinflussen. Dabei kann die Neutralisation der Verozell-Zytotoxizität durch Stx-spezifische Antikörper vermittelt werden (214, 273). Probenmaterial kann jedoch auch weitere neutralisierende Komponenten aufweisen. So enthalten humane Seren das Stx2-neutralisierende HuSAP (human serum amyloid P component) (124). Von Rinderkolostrum ist bekannt, dass sie verschiedene Oligosaccharide enthalten können (289), die möglicherweise Stx binden (4). Humane und bovine Milch enthält neutrale Glykosphingolipide, darunter auch Globotriaosylceramid (Gb₃) (182, 297). Aus boviner Milch aufgereinigtes Gb₃ kann die zytotoxische Wirkung von Stx2 im Verozelltest reduzieren (297). Es ist anzunehmen, dass solche Gb₃-Moleküle auch im Rinderkolostrum vorhanden sind. So erreicht beispielsweise der Gehalt an Gangliosiden, Sphingolipiden mit einer Sialinsäure-enthaltenden Kopfgruppe, die höchste Konzentration im Kolostrum. Erst mit zunehmender Dauer der Laktationsperiode nimmt ihre Konzentration in der Milch wieder ab (223, 224). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es durch die

Anwesenheit CD77-spezifischer Antikörper zu einer Störung der Toxin-Rezeptor-Interaktion kommt. CD77 wurde im Tegument der Leberegel *Fasciola hepatica* und *Fasciola gigantica* nachgewiesen (314). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass Tiere in Leberegel-Endemiegebieten CD77-spezifische Serumantikörper aufweisen könnten. Pirro *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Neutralisierung von Stx durch bovine Seren und Kolostren im Vero-NT nicht von einer Interaktion unspezifischer Faktoren mit dem zellulären Rezeptor herrührt, sondern vor allem durch IgG₁ vermittelt wird (220).

Mit dem kompetitiven ELISA stand ein Detektionssystem zur Verfügung, mit dem Probenbestandteile nachgewiesen wurden, die eine Interaktion zwischen Toxin und Fangantikörper verhindern. Dieser Kontakt könnte auch durch unspezifisch bindende Probenbestandteile hervorgerufen werden. Allerdings konnten mit der Methode Titerverlaufskurven erzeugt werden, die kongruent zu den im Vero-NT bestimmten verliefen. Auch bestätigte der ELISA negative Ergebnisse des Vero-NT in allen untersuchten Seren.

Im Immunoblot-Verfahren mit aufgereinigtem Stx1 konnten Stx1-spezifische bovine Immunglobuline verschiedener Subklassen in Serumproben von Kälbern und Muttertieren schließlich direkt nachgewiesen werden. Wie der kompetitive ELISA erfasst das System auch diejenigen Stx-spezifischen Antikörper, die im Zellkulturmodell keine neutralisierenden Eigenschaften besitzen. In drei Serumproben eines Kalbes konnten mithilfe des Immunoblots Stx1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden obwohl diese keine Stx1-spezifischen Titer im Vero-NT zeigten. Dies ist wahrscheinlich mit der sehr hohen Sensitivität dieser Nachweismethode zu erklären, die wie bei Raymond *et al.* gezeigt, sogar höher als die des Vero-NT ist (226). Die Unfähigkeit der in den drei Serumproben mittels Immunoblot nachgewiesenen Antikörper, Vero-Zellen vor der Wirkung von Stx1 zu schützen, unterstreicht die Notwendigkeit des Neutralisationstestes als Nachweissystem für Stx-spezifische Antikörper, die eine schützende Wirkung im Verozell-System und somit möglicherweise auch *in vivo* aufweisen.

Unter natürlichen Bedingungen sind Rinder einem ständigen Infektionsdruck durch STEC mit unterschiedlicher Virulenzgen-Ausstattung ausgesetzt. Die humorale Stx-Immunität richtet sich dementsprechend gegen diejenigen Varianten von Stx, welche von den im Rinderbestand vorherrschenden STEC-Klonen im Verlaufe einer Infektion gebildet werden. Der Vero-NT ermöglichte es, die Neutralisationsfähigkeit von Proben gegenüber verschiedenen Stx-Varianten zu überprüfen, da alle beschriebenen Varianten von Stx1 und Stx2 eine zytotoxische Wirkung auf Verozellen aufweisen (19). In der vorliegenden Arbeit wurde kommerziell erhältliches Stx2 eines EHEC O157:H7 verwendet. Aufgrund von

Literaturangaben verschiedener Autoren ist davon auszugehen, dass eine Neutralisation von Stx2 nicht nur durch Stx2-spezifische Antikörper selbst, sondern auch durch Antikörper, welche sich gegen genetisch nahe Stx2-Varianten (Stx2c, Stx2d) richten, hervorgerufen wird (245, 288) (Kapitel IV). Stx2-positive STEC vom Rind weisen in Europa (17, 202, 323) und weltweit (37, 294) hauptsächlich *stx2*, *stx2c* sowie *stx2d* auf. Die übrigen *stx2*-Varianten werden nur äußerst selten bei Rindern nachgewiesen. Die eigenen Daten zur STEC-Ausscheidung, die das Vorkommen ausschließlich der *stx2*-Varianten *stx2* und *stx2c* in der Kälberpopulation zeigten, bestätigen dies für die hier untersuchten Tiere. Der kompetitive ELISA ermöglichte es, zusätzlich zum Nachweis von Stx1- und Stx2-spezifischen Antikörpern im Vero-NT, Seren auch auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen Stx2c zu überprüfen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Stx2c-spezifische Antikörper, die die im Vero-NT eingesetzte Stx2-Variante aufgrund von Konformationsunterschieden nicht neutralisieren könnten, nicht erfasst wurden.

Es gibt bisher keine Hinweise, dass die in ihrer Aminosäuresequenz nur wenig voneinander abweichenden Stx1-Varianten (Kapitel IV) nicht übergreifend von Stx1-spezifischen Antikörpern neutralisiert würden (189, 273). Verschiedene monoklonale Antikörper neutralisieren die zytotoxische Wirkung von Stx1 und *Shigella dysenteriae*-Toxin gleichermaßen (273). Deshalb ist davon auszugehen, dass das im Vero-NT verwendete Stx1 eines EHEC O157:H7 von Rinderseren neutralisiert wird, auch wenn sich die Tiere immunologisch mit verschiedenen Stx1-Varianten auseinandergesetzt haben.

Die Verwendung des Vero-NT, ergänzt durch kompetitiven ELISA und Immunoblot, erlaubte deshalb mit hinreichender Sicherheit die Quantifizierung von Stx1- und Stx2-spezifischen Antikörpern in bovinen Serum-, Milch- und Kolostrumproben.

Bei den Muttertieren konnten neutralisierende Stx1-spezifische Serumantikörper (Stx1Ak) in allen Serum- und Kolostrumproben nachgewiesen werden. Die Antikörpertiter wiesen dabei Werte bis 12046 auf und zeichneten sich durch eine hohe Variabilität zwischen den Einzelindividuen aus. In den Milchproben der Muttertiere fanden sich Stx1Ak nur vereinzelt und ausschließlich in niedrigen Titern. Die im Vergleich zu den Serumtitern höheren Stx1Ak-Titer im Kolostrum der Muttertiere weisen auf eine effektive Anreicherung dieser Antikörper im Kolostrum hin, wie es für Immunglobuline des Rindes beschrieben wurde (35, 43, 185, 221). Die niedrigen Titer von Stx1Ak in den Milchproben sind durch die zunehmende Verdünnung der enthaltenen Antikörper mit steigender Milchproduktion, sowie mit der

außerhalb der Hochträchtigkeit geringeren Anreicherung von Immunglobulinen aus dem Serum der Tiere erklärbar (10, 12, 35, 43, 67, 137, 185, 221, 261, 310).

Bei den neugeborenen Kälbern, welche noch kein Kolostrum aufgenommen hatten, konnten zum ersten Entnahmezeitpunkt keine Stx1Ak detektiert werden. Schon bei der zweiten Probenentnahme, d.h. nach der Kolostrumaufnahme, waren Stx1Ak bei 31 von 34 untersuchten Tieren nachweisbar. Kolostrale Immunglobuline werden rasch nach dem Saugakt resorbiert, so dass bereits 24 h p.n. Serum-IgG/IgG₁-Gehalte von 6,7-48,2 mg/ml erreicht sind (10, 48, 67, 133, 145, 169, 186, 261, 316, 317).

Die Titermaxima von Stx1Ak in den Kälberseren wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Geburt erreicht. Während bei den meisten Tieren die Maxima zum zweiten Entnahmezeitpunkt (24 h p.n.) erreicht waren, war dies bei wenigen Tieren erst in der 1. Lebenswoche der Fall. Die individuell verschiedenen Zeitpunkte des Titermaximums sind wahrscheinlich durch das unterschiedliche Eintreten des Darmschrankenschlusses (sog. „gut closure“) bedingt. Der Zeitpunkt, an dem das neonatale Darmepithel die Resorptionsfähigkeit für kolostrale Immunglobuline verliert, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Angaben über das Eintreten des Darmschrankenschlusses schwanken für die unterschiedlichen Immunglobulinklassen von 21-48 Stunden nach der Geburt für IgG, 16-23 Stunden für IgM und 23-25 Stunden für IgA (48, 122, 269). Allerdings kann sich dieser Zeitpunkt bis zur 33., 31. und 32. Stunde nach der Geburt für IgG, IgM bzw. IgA verschieben, wenn die Tiere erst verspätet Kolostrum aufnehmen (269, 270). Dementsprechend ist auch der Zeitpunkt der maximalen Immunglobulinspiegel im Serum von neugeborenen Kälbern sehr unterschiedlich und liegt bei 12-24 Stunden, in Ausnahmefällen auch bei mehreren Tagen nach der Kolostrumaufnahme (10, 48, 133, 261).

Auffällig ist der rasche Abfall Stx1-spezifischer Titer, welcher bei den Kälbern mit einer Ausnahme innerhalb der ersten drei Lebenswochen einsetzt. Bei einem Großteil der Tiere sind Stx1Ak bis zum Ende des dritten Lebensmonats nicht mehr oder nur noch in geringer Höhe nachweisbar. Nur bei Tieren mit initial hohen Antikörpertitern konnten Stx1Ak bis zum Ende des vierten Monats oder sogar länger detektiert werden. Der rasche Titerabfall der maternalen Stx1Ak im Serum der Kälber kann mit der natürlichen Halbwertszeit von Immunglobulinen erklärt werden. IgG stellt mit rund 81 % die größte Immunglobulinfraktion im Kolostrum dar. IgA und IgM repräsentieren dagegen nur rund 7 %, IgG₂ nur 5 % aller Immunglobuline des bovinen Kolostrums (43). Trotz eventueller Resorptionsunterschiede der Immunglobulinklassen (33-35, 48, 104, 122, 219, 239, 271), stellt IgG auch im Serum neugeborener Kälber nach Kolostrumaufnahme das prozentual am stärksten vertretene

Immunglobulin dar (35). Die Halbwertszeit des bovinen IgG im Serum beträgt 16 bis 32 Tage (13, 64, 104) und ist damit deutlich länger als die von IgM (4 Tage) (104) und IgA (2-3 Tage) (7, 146). Bei einem Großteil der untersuchten Tiere dieser Studie bewegt sich der Abstand zwischen der Kolostrumaufnahme und der Halbierung des Titers in diesem zeitlichen Rahmen. Bei wenigen Ausnahmen kam es innerhalb eines kürzeren Zeitraumes als 16 Tagen zu einer Halbierung der Titerhöhen. Eine Ursache könnten ebenfalls aus dem Kolostrum resorbierte Stx1Ak anderer Immunglobulinklassen darstellen, die kürzere Halbwertszeiten im Serum aufweisen als IgG.

Nur 5 der untersuchten Kälber reagierten innerhalb der ersten sechs Lebensmonate mit einer Stx1-spezifischen Serokonversion. Auch bei einer Folgeuntersuchung von mehr als sechs Monate alten Tieren, konnten endogene Stx1Ak meistens erst im Alter von 0,5 bis 2,5 Jahren nachgewiesen werden. Eine Serokonversion bleibt somit noch lange nach dem Abfall der Kolostralantikörper aus. Auch bei den fünf serokonvertierten Tieren erfolgte die Konversion in zeitlich großem Abstand zum minimalen maternalen Titer. Zudem kam es nur zu wenige Wochen andauernden Titeranstiegen. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu der Fähigkeit von Kälbern, bereits innerhalb der ersten Lebenswochen eine eigene spezifische Immunität gegenüber verschiedenen Antigenen aufzubauen (283). Aufgrund der besonderen Verhältnisse der syndesmochorialen Plazenta beim Rind kommt es beim Kalb vor der Trächtigkeit nicht zum Transfer maternaler Immunglobuline auf das neugeborene Tier (201, 283). Bei kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern können jedoch bereits in der ersten Lebenswoche IgG, IgM und IgA nachgewiesen werden (7, 10, 258). In Infektionsversuchen reagieren Kälber bereits wenige Tage nach der Geburt mit der Produktion Antigen-spezifischer Immunglobuline (98, 123, 231, 232, 283). Im Gegensatz dazu kommt es zu einer Unterdrückung der Produktion endogener Immunglobuline, solange maternale Antikörper beim neugeborenen Kalb vorhanden sind (68, 98, 105, 123, 145, 228, 232, 283). Zur Induktion spezifischer endogener Immunglobuline kommt es erst, wenn der Spiegel an maternalen Antikörpern einen bestimmten Schwellenwert unterschritten hat (283). Die beobachtete humorale Immunreaktion gegenüber Stx1 bei jungen Kälbern unterscheidet sich somit wesentlich von Immunreaktionen gegenüber anderen Antigenen.

Die Prävalenz Stx2-spezifischer Antikörper bei den Muttertieren lag mit 9,7 % in Serum- und 24,2 % in Kolostrumproben deutlich niedriger als für Stx1Ak. Zudem waren solche Antikörper ausschließlich in geringen Titern von 30 nachweisbar. In den Milchproben konnten keine Stx2Ak detektiert werden. Eine niedrige Prävalenz von Stx2Ak in Serum- und Kolostrumproben natürlich infizierter Rinder wird auch von weiteren Autoren beschrieben

(31, 220). Ähnlich wie bei Stx1Ak kommt es offensichtlich ebenfalls zu einer Anreicherung von Stx2Ak im maternalen Kolostrum. Dafür spricht der Nachweis von Stx2Ak bei Tieren, bei denen keine Stx2Ak im Serum, wohl aber im Kolostrum nachgewiesen werden konnten.

Bei den neugeborenen Kälbern konnten Stx2Ak in nur drei Fällen und ausschließlich in niedrigen Titern detektiert werden. Dabei handelt es sich um diejenigen Kälber, deren Muttertiere ebenfalls Stx2Ak im Serum aufwiesen. Dies und der rasche Abfall von Stx2Ak innerhalb der ersten Lebenswochen verdeutlicht, dass auch Stx2Ak, wenngleich auf einem niedrigerem Niveau als Stx1Ak, via Kolostrum auf neugeborene Kälber übertragen werden und dort aufgrund der natürlichen Halbwertszeit der Immunglobuline nach der Geburt rasch verschwinden. Auffällig ist die ausbleibende humorale Immunreaktion der Kälber gegenüber Stx2. Bei keinem Kalb konnten innerhalb des Untersuchungszeitraumes endogen gebildete Stx2Ak detektiert werden. Mögliche Erklärungsansätze für die ausbleibende Stx2-spezifische Serokonversion bei Kälbern und adulten Rindern werden in einem späteren Abschnitt erörtert.

Die Stx-spezifische Zytotoxizität für Verozellen beruht im Wesentlichen auf der rezeptorvermittelten Endozytose des Holotoxins, dessen Transfer zum Trans-Golgi-Apparat und retrograden Transport zum Endoplasmatischen Retikulum. Dort wird die aktive A-Untereinheit ins Zytosol geschleust und entfaltet ihre zytotoxische Wirkung durch Zerstörung ribosomaler RNA (143, 236). Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen die beiden Untereinheiten von Stx zeigten, dass eine Protektivität in diesem System sowohl durch Antikörper gegen die A- als auch durch Antikörper gegen die B-Untereinheit vermittelt werden kann (214, 273). Die Überprüfung von Seren im Immunoblot ermöglichte es, das Vorhandensein spezifischer Immunglobuline gegen die Stx1 A- (StxA1)- und Stx1 B-Untereinheit (StxB1) in Serumproben zu überprüfen. Dabei wiesen Seren von Kälbern und Muttertieren Stx-spezifische Immunglobuline gegen die A- oder die A- und B-Untereinheit, niemals jedoch ausschließlich gegen die B-Untereinheit auf. Sowohl Seren mit hohen Gehalten an StxB1-spezifischen-Antikörpern als auch Seren, die ausschließlich Antikörper gegen StxA1 aufwiesen, erzielten bei der Untersuchung im Vero-NT hohe Neutralisationstiter. Dies zeigt, dass auch bovine StxA1-spezifische Antikörper eine Protektivität im Verozellsystem vermitteln können.

Die Wirkung von Stx1 auf bovine IEL erforderte die Anwesenheit des aktiven Holotoxins (172). Allerdings kann bereits die Bindung der Stx1B-Untereinheit alleine eine Hemmung der Proliferation boviner peripherer Lymphozyten bewirken (260). Ursache hierfür könnte eine durch die Bindung der B-Untereinheit ausgelöste starke Kreuzvernetzung von CD77-

Molekülen auf der Zelloberfläche sein. In Modellen mit Lymphomzellen kann dieser Vorgang die Apoptose von Zellen induzieren (278). Die Bindung der StxB-Untereinheit an humane Nierenepithelzellen zieht eine Erhöhung der intrazellulären Zeramidkonzentration sowie die Induktion „Toll-like“ Rezeptor (TLR) 4-abhängiger Signalwege nach sich (72). Dies könnte bedeuten, dass die in dieser Studie im Vero-NT aufgrund ihrer Verozytotoxizität neutralisierenden Eigenschaften nachgewiesenen Antikörper bei STEC-Infektionen des Rindes *in situ* nicht oder nur bedingt protektiv wirken.

Wesentlich für die Interpretation der in dieser Arbeit erhobenen Befunde zum Auftreten von Stx-spezifischen Antikörpern bei Kälbern ist die Beantwortung der Frage, ob die Tiere im Untersuchungszeitraum tatsächlich mit STEC infiziert waren.

Zum Monitoring der STEC-Ausscheidung wurde die PCR als Nachweismethode für Stx-Gene gewählt. Da Stx-Gene nahezu ausschließlich bei STEC anzutreffen sind (119, 177), kann der Nachweis von *stx* in Kotproben mit der Ausscheidung von STEC gleichgesetzt werden. Die hohe Sensitivität der Technik konnte mit inokulierten Kotproben bestätigt werden. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, dass trotz einer hohen Sensitivität ein positives Ergebnis möglichst nur bei Anwesenheit vermehrungsfähiger Keime angezeigt wird. Gene nicht vermehrungsfähiger Keime konnten mit der angewandten Methode erst dann nachgewiesen werden, wenn *stx*-negative Kotproben mit Genäquivalenten von mindestens 1×10^5 - 1×10^6 inaktivierten Keimen / g Kot inokuliert wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass nicht vermehrungsfähige Passanten des Darmtraktes bei der Untersuchung erfasst wurden ist deshalb als gering anzusehen.

Zur Absicherung der Ergebnisse aus den PCR-Untersuchungen wurden 65 STEC-Stämme aus *stx*-positiven Kotproben isoliert und hinsichtlich Virulenzgenen, Wachstumseigenschaften auf Selektivnährböden und *in vitro*-Produktion von Stx charakterisiert. Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurden insgesamt 14 STEC-Klone mit 9 unterschiedlichen Virulenzprofilen identifiziert. Bei einem Teil der Isolate waren alle drei überprüften Virulenzgene nachweisbar (*stx*, *eae* und *ehxA*). Alle *eae*-positiven Stämme waren auch *ehxA*-positiv. Es konnte jedoch nicht in allen *ehxA*-positiven Isolaten *eae* detektiert werden. Alle *stx1*-positiven Isolate enthielten das Intimingen *eae*. Stämme die ausschließlich positiv für Stx2-Gene waren, wiesen dagegen in mehreren Fällen kein *eae* auf. Es wurde bereits beschrieben, dass bei bovinen Stx1-produzierenden STEC-Isolaten häufiger *eae* vorkommt, als in Stx2-bildende STEC (103, 128, 151, 198, 308). Bei der Typisierung der *eae*-Varianten konnten die Intimine ζ , $\beta 1$ und $\epsilon 1$ detektiert werden. Die in dem untersuchten Bestand

isolierten STEC weisen damit für bovine STEC-Isolate typische Virulenzgen-Profile auf (3, 24-26, 47, 50, 83, 107, 128, 138, 198, 202, 252, 294-296, 306, 308, 322, 323).

Über genotypische Untersuchungen hinaus wurden die Stämme auch phänotypisch charakterisiert. Im Giemsa-Test war es möglich, die Fähigkeit zur Bildung von Mikrokolonien und die daraus resultierende Adhäsionsform der STEC-Stämme zu visualisieren (3, 88, 256, 286). Die Eigenschaft, im Zuge dieser Haftung („attaching“), das Ablösen des Mikrovillisaumes („effacing“) und die Umstrukturierung des Zytoskelettes, sogenannte A/E-Läsionen, hervorzurufen, wurde *in vitro* durch den FAS-Test überprüft (53, 75, 177, 308). Alle überprüften STEC-Stämme waren in der Lage, an die verwendeten Zelllinien zu binden. Die Adhäsion war dabei meist von lokalem (LA) oder aggregativem (AA) Charakter und entspricht damit den bei bovinen STEC bereits beschriebenen Anheftungsmustern (3, 69, 127, 166, 306). Während der EPEC-Kontrollstamm E2348/69 auf HEp2- und Kolonkryptenzellen in beiden Adhäsionstests identisch reagierte, unterschieden sich die Resultate bei den bovinen STEC-Isolaten je nach verwendeter Zelllinie. Von einer Variabilität der Adhäsionseigenschaften von STEC-Stämmen an verschiedene Zelllinien wurde bereits früher berichtet (256, 306). Es wurde bereits berichtet, dass nur ein Teil aller bovinen STEC im FAS-Test positive Reaktionen hervorruft (3, 69, 303, 308). So konnte Erpenstein beispielsweise bei nur 41,4 % aller überprüften bovinen STEC eine positive Reaktion im FAS-Test feststellen (69). Selbst unter *eae*-positiven STEC-Isolaten konnte Wieler bei einem Drittel der Stämme keine positive Reaktion im FAS-Test detektieren (303). Er stellt außerdem fest, dass STEC aus durchfallkranken Tieren signifikant häufiger eine positive Reaktion im FAS-Test aufweisen als Isolate gesunder Tiere (303). Die in der vorliegenden Studie gewonnenen bovinen STEC-Isolate stammten jedoch ausnahmslos von klinisch gesunden Tieren. Zu erwähnen bleibt auch, dass 5 der 7 in den Adhäsionstests untersuchten bovinen STEC-Isolate *stx2*-spezifische Gensequenzen aufwiesen. Dabei zeigten zwei Isolate Gene für ausschließlich *stx2c*. Ein Isolat wies *stx1*- als auch *stx2*-spezifische Gensequenzen auf, ein weiterer Stamm beherbergte *stx2*- und *stx2c*-Gene. Bei den beiden im FAS-Test positiv getesteten STEC-Stämmen handelte es sich dagegen um Isolate, welche ausschließlich *stx1*-spezifische Gensequenzen aufwiesen. Dies deckt sich mit Angaben der Literatur, wonach der Anteil FAS-positiver Stämme bei Stx1-bildenden STEC deutlich höher als bei Stx2- und Stx1/Stx2-produzierenden STEC-Stämmen liegt, beziehungsweise eine FAS-Reaktion bei Stx1-bildenden STEC deutlicher ausfällt (69, 287). Der vergleichsweise niedrige Anteil FAS-positiver STEC-Stämme in der vorgelegten Arbeit könnte auch in der Bewertung des FAS-Tests begründet sein. In einigen Veröffentlichungen wurden Reaktionen

im FAS-Test bereits dann als positiv bewertet, wenn eine einzige Zelle mindestens ein positives Signal aufwies (69, 303, 306, 308). Im Rahmen dieser Untersuchung geschah dies erst bei mindestens 10 positiven Signalen. Dadurch konnten A/E-Läsionen zwar eindeutig von zufälligen Aktinverdichtungen im Zytosol unterschieden werden, dies könnte bei der Auswertung des Testes aber zu der vergleichsweise häufigen negativen Beurteilung der FAS-Reaktion beigetragen haben.

Der häufige Nachweis einer STEC-Ausscheidung mittels PCR sowie die genetische und phänotypische Charakterisierung einer Auswahl von STEC-Stämmen aus dem beprobten Bestand spricht dafür, dass die Kälber während des Untersuchungszeitraumes tatsächlich mit STEC infiziert waren, diese *in vivo* an das Darmepithel der Tiere gebunden und während der Kolonisierung Stx gebildet haben.

Im gesamten Untersuchungszeitraum konnten Stx-Gene in 195 (35,9 %) Kälberkotproben nachgewiesen werden. Bei allen 29, mindestens zehn Wochen lang beprobten Kälbern war *stx* zu wenigstens einem Beprobungszeitpunkt im Kot detektierbar. Bei fünf Kälbern konnten bereits innerhalb der ersten 24 Lebensstunden Stx-Gene nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil *stx*-positiver Tiere stieg von der ersten (14,3 %) bis zur 11. Lebenswoche (61,5 %) kontinuierlich an und bewegte sich bis zum Ende des sechsten Lebensmonats auf einem konstant hohem Niveau (40,0 – 58,3 %). Die Tiere der vorgelegten Studie werden im Alter von 12 Wochen von der MAT-Tränke per Eimer abgesetzt. Der Anteil *stx*-positiver Kälber lag in den Lebenswochen nach dem Absetzen (13-24. LW) mit einer Ausnahme stets höher (40,0 - 56,5 %) als in den ersten 10 Lebenswochen (14,3 - 46,2 %). Der Anteil *stx*-ausscheidender Kälber übersteigt in jedem Altersabschnitt (14,3-61,5 %) den Anteil *stx*-positiver Muttertiere außerhalb der Abkalbungsphase (9,6 %).

STEC können schon bei sehr jungen Kälbern, zum Teil wenige Stunden nach der Geburt, detektiert werden (24, 49, 52, 80, 235, 301, 308). Auch eine erhöhte STEC-Prävalenz bei abgesetzten Kälbern im Vergleich zu jüngeren Tieren sowie der häufigere Nachweis von STEC bei Kälbern im Vergleich zu adulten Rindern wurde in zahlreichen Untersuchungen festgestellt (49, 80, 97, 309, 320). Die hohe STEC-Ausscheidung während der Sommermonate und der Abfall der STEC-Nachweisraten zum Winterhalbjahr entspricht ebenfalls den Beobachtungen zahlreicher Autoren (90, 91, 97, 276). Die im beprobten Bestand erhobenen Befunde zur Häufigkeit der STEC-Ausscheidung entsprechen somit der weiten Verbreitung von STEC in Rinderbeständen, insbesondere bei Kälbern (Kapitel IV) (24, 49, 52, 83, 107, 128, 298).

Die Untersuchung der Stx-Gen-Profile in den Kotproben ergab, dass die meisten Proben positiv für Stx1- und Stx2-Gene waren (16,2 %). Ausschließlich Gene für Stx2 konnten in 13,6 %, für Stx1 in nur 6,1 % aller Kotproben nachgewiesen werden. Die *stx2*-Varianten *stx2* und *stx2c* waren etwa gleich häufig nachweisbar. Bei keinem der Kälber konnten die *stx2*-Varianten *stx2d*, *stx2e* oder *stx2f* nachgewiesen werden. Weiterhin fiel ein Unterschied zwischen der *stx1*- bzw. *stx2*-STEC-Ausscheidung auf, der sich in einer insgesamt früheren Etablierung von *stx1*-STEC in der Kälbergruppe äußerte. Die Ergebnisse spiegeln die große Variabilität von STEC-Stämmen innerhalb einer kleinen oder geographisch isolierten Population von Rindern wider (49, 50, 83, 107, 213, 252). Weltweit werden bei natürlich infizierten Kälbern STEC-Stämme nachgewiesen, die *stx1*, *stx2* oder beide Gene gleichzeitig aufweisen (24, 47, 50, 213, 252, 305). In einigen Untersuchungen dominieren dabei *stx1*- (47), in anderen *stx2*- oder *stx1/stx2*-positive Stämme (24, 252). Viele Autoren stellen fest, dass sich die *stx*-Profile der Isolate innerhalb verschiedener Altersgruppen unterscheiden. So dominieren *stx1*-STEC in Saugkälbern, während *stx2*-STEC häufiger bei Isolat aus abgesetzten Kälbern oder adulten Tieren nachgewiesen werden (24, 50, 235, 237, 252, 305). Die *stx2*-Varianten *stx2* und *stx2c* werden bei bovinen STEC-Isolaten von Kälbern und Adulten am häufigsten nachgewiesen (84, 149, 252, 294). Weniger häufig erfolgt ein Nachweis von *stx2d*-Typen (84, 294) und nur gelegentlich werden die Varianten *stx2e* (202), *stx2-NV206* (11) sowie *stx2g* (81, 139, 294) detektiert. Ein Nachweis von *stx2f* bei bovinen STEC-Isolaten ist bisher nicht bekannt.

Ein positiver *stx*-Nachweis erfolgte häufig an mehreren Beprobungszeitpunkten nacheinander. Während bei einem Tier an insgesamt elf aufeinander folgenden Entnahmezeitpunkten *stx* im Kot nachgewiesen werden konnte, wurde bei anderen Kälbern *stx* nur selten detektiert. Zudem wiesen die Kotproben von mehrmals hintereinander *stx*-positiv getesteten Tieren häufig das gleiche Stx-Gen-Profil auf. Die Ergebnisse sind mit Daten verschiedener Langzeitstudien zur STEC-Ausscheidung bei Kälbern vergleichbar. Selbst innerhalb kleiner Tierkollektive scheidet ein Teil der Kälber mehrfach hintereinander STEC aus, andere tun dies nur vereinzelt (213, 230, 252, 301). Ein mehrmaliger *stx*-Nachweis mittels PCR kann das wiederholte Ausscheiden ein und desselben STEC-Klones nicht beweisen. Da die Dominanz einzelner STEC-Klone bei der Untersuchung kleinerer Tiergruppen bereits beschrieben wurde (17, 213, 252), könnte das wiederholte Auftreten gleicher *stx*-Muster bei einem Tier durch eine länger andauernde Ausscheidung eines STEC-Klones hervorgerufen sein. Offen bleibt allerdings, ob der in dieser Arbeit erfolgte Nachweis verschiedener Stx-Gene in einer Kotprobe auf die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer STEC-Klone oder aber eines Klones mit verschiedenen

stx-Varianten zurückzuführen ist. Die mehrfach erfolgte Isolation von zwei oder mehr verschiedenen STEC-Klonen aus einer einzigen Kotprobe wurde bereits beschrieben (24, 107, 166, 213, 252). Darüber hinaus gelang bei einzelnen Proben aber auch die Isolation nur eines einzigen STEC-Stammes, der mehrere *stx*-Varianten aufwies.

Die erhobenen Daten zur STEC-Ausscheidung sprechen für den umfangreichen und zum Teil lang anhaltenden Kontakt der Tiere mit Kälber-typischen STEC-Stämmen. Das Zirkulieren mehrerer STEC-Klone in der Herde sowie deren gehäuftes Auftreten bei unterschiedlichen Altersgruppen innerhalb des Betriebes verdeutlichen ebenso wie die saisonale Abhängigkeit der STEC-Ausscheidung, dass der untersuchte Bestand als repräsentativ anzusehen ist.

Trotz frühzeitiger und wiederholter Ausscheidung von Stx1- und Stx2-bildenden STEC wurden Stx-spezifische Antikörper nur bei einer Minderheit der Kälber nachgewiesen. Eine niedrige Prävalenz von Stx2Ak bei natürlich infizierten Rindern wurde bereits beschrieben (31, 220). Die niedrige Prävalenz von Stx1Ak bei natürlich infizierten Kälbern war bislang übersehen worden, da sich entsprechende Untersuchungen stets auf adulte Tiere beschränkten (31, 220). Die niedrigen Stx1Ak-Titer im Kälberalter, die geringe Anzahl von Kälbern mit Stx1-spezifischer Serokonversion und die späte Induktion der Stx1-spezifischen Immunität könnten durch eine geringe Immunogenität von Stx1 bedingt sein. Erste Hinweise auf eine geringe Immunogenität der Stx ergaben sich aus experimentellen STEC-Infektionen. Hier waren Stx2Ak generell nur schlecht induzierbar (101, 116). Stx1Ak waren bei Kälbern schwer und nur nach wiederholter Inokulation mit Stx1-bildenden STEC induzierbar, bei adulten Tieren nur mit großen individuellen Unterschieden (116). Als mögliche Ursache für die geringe Immunogenität von Stx1 und Stx2 könnten 1.) die unzureichende Bildung von Stx im bovinen Darm, 2.) eine ungenügende Translokation von Stx zu den Effektorzellen der humoralen Immunität oder 3.) immunsupprimierende Effekte des Toxins auf die humorale Immunität in Frage kommen.

ad 1.) Der Nachweis von Stx im Kot von Rindern gelang einigen Autoren, wenn entsprechende Kotproben in einer Nährbouillon vorinkubiert wurden (6, 106, 251, 291). Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Stx-Bildung erst *in vitro* erfolgte. In der vorgelegten Arbeit wurde versucht, freies Stx in unbehandelten Kälberkotproben nachzuweisen. Die zur Durchführung verwendeten Kotproben waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits einige Monate bei -70 °C gelagert worden, so dass ein negativer Einfluss durch das Einfrieren, Lagern und Auftauen der Proben nicht ausgeschlossen werden kann. Dennoch gelang der Nachweis von freiem Stx in drei der 76 untersuchten Proben. Die

Detektion von Stx in Zellkulturüberständen aus den Adhäsionstests weist ebenfalls darauf hin, dass die STEC-Isolate auch im bovinen Wirt während der Kolonisierung zur Stx-Produktion fähig sind.

ad 2.) Gegen eine ungenügende Translokation von Stx im bovinen Darm sprechen die Infektionsversuche von Hoffmann *et al.* (101). Dabei wurden 6-8 Wochen alte Kälber zweimal im Abstand von drei Wochen mit einem Stx2-bildenden STEC O157:H7 inokuliert. Nach weiteren drei Wochen erfolgte die Belastungsinfektion mit dem gleichen STEC-Stamm. Die Tiere entwickelten nur mit deutlicher Verzögerung eine zelluläre STEC-Immunität im Vergleich zu Kälbern, die mit einem Stx-negativen *E. coli* O157:H7 inokuliert worden waren. Das unter der Kolonisierung enteral gebildete Stx2 des STEC-Inokulationsstammes reichte demnach aus, die Entwicklung der Immunität systemisch zu supprimieren. Zudem gibt es Hinweise, wonach STEC bis in die *Lamina propria* (59) und in die Mesenteriallymphknoten (247) vordringen können und dort vermehrungsfähig bleiben. Dort könnte selbst bei Produktion kleinster Mengen Stx eine ausreichende Menge Antigen entstanden sein, um eine humorale Immunantwort zu induzieren.

ad 3.) Stx könnte auch aktiv die Bildung von Stx-spezifischen Antikörpern unterdrückt haben. Bovine B-Zellen reagieren *in vitro* zwar empfindlich auf die Wirkungen von Stx, *in vivo* kommt es jedoch nicht zu einer generalisierten Supprimierung der humoralen Immunität. So entwickelten die Kälber im Versuch von Hoffmann *et al.* nach STEC O157:H7-Infektion, trotz verzögerter zellulärer Immunität, O157-spezifische Antikörper in gleicher Menge und zeitlichem Verlauf wie Kälber der Kontrollgruppe (101). Da es sich bei Stx, im Gegensatz zum *E. coli* O157-LPS (283), um ein T-Zell-abhängiges Antigen handelt, wäre allerdings denkbar, dass Stx eine supprimierende Wirkung auf T-Helferzellen entfaltet. In der Tat sind bovine CD4⁺ T-Zellen des peripheren Blutes *in vitro* zwar nur gering empfindlich gegenüber Stx (165) und auch CD4⁺-IEL weisen *ex vivo* wenig CD77-Rezeptoren auf (163), die Expression von CD77-Rezeptoren auf bovinen T-Zellen ist *in vitro* aber leicht durch Mitogene induzierbar (165). Es ist deshalb möglich, dass Stx eine lokale Suppression von T-Helferzellen an den „inductive sites“ des intestinalen Immunsystems auslöst und dies selektiv die Entwicklung einer gegen ein Proteinantigen wie Stx gerichteten humoralen Immunität blockiert.

Diese Hypothese würde auch die in dieser Studie und von anderen Autoren gemachte Beobachtung erklären, warum Stx1-spezifische Antikörper beim Rind häufiger als Stx2-spezifische detektierbar sind, wenn man annimmt, dass die Toxine bovine T-Helferzellen mit

unterschiedlicher Effizienz inhibieren. Es bleibt aber in zukünftigen Untersuchungen zu klären, ob Rinder im Verlauf einer STEC-Infektion nicht einfach nur unterschiedlichen Mengen der Toxine ausgesetzt werden. So wird die Expression von Stx1 und Stx2 in STEC unterschiedlich reguliert. Die Expression von Stx1 hängt vor allem vom Eisengehalt des die Bakterien umgebenden Mediums ab. Bei niedriger Eisenkonzentration kommt es zu einer höheren Toxinexpression. Dagegen ist die Stx2-Expression unabhängig von der Eisenkonzentration und wesentlich von der Induktion der *stx2*-Phagen abhängig (78, 174, 181). Möglicherweise könnten so die natürlichen Milieubedingungen im Darm des Rindes die Bildung von Stx1 stärker als die Bildung von Stx2 begünstigen.

Keine Rolle in Bezug auf die Frage der Menge an Stx1- und Stx2-Antigen, mit denen sich Rinder auseinandersetzen, spielen vermutlich die Bindungseigenschaften der Toxine an ihre zellulären Rezeptoren. Obwohl beide Toxine den gleichen funktionellen Rezeptor besitzen, weist Stx1 eine etwa 10-mal höhere Bindungsaffinität zu Gb₃ auf als Stx2 (94, 175). Hoey *et al.* zeigten, dass Stx1 an bovine Kolonzellen bindet und dass es sich bei den zugehörigen Rezeptoren um Gb₃-Moleküle handelt (99). Das gebundene Stx1 wurde durch die Zellen internalisiert und lysosomal degradiert (100). Schüller *et al.* beschrieben ebenfalls, dass Stx1 an bovine Jejunum-, Ileum- und Caecumorganproben im Bereich der Darmkrypten binden kann, stellten aber fest, dass eine Bindung von Stx2-Molekülen nicht erfolgte (248). Eine mögliche Ursache sehen die Autoren in der Bindung der beiden Toxintypen an unterschiedliche Isoformen des Gb₃-Rezeptors, da auch bekannt ist, dass es auf Gb₃-Rezeptoren unterschiedliche Bindungsstellen für Stx1 und Stx2 gibt (109). Gegen die Bedeutung von Gb₃-artigen Rezeptoren für die etwaige unterschiedliche Effizienz der enteralen Resorption von Stx1 und Stx2 durch die bovine Darmwand sprechen allerdings die Ergebnisse von Pruimboom-Bress *et al.* sowie Stamm *et al.* die auf der Oberfläche von Epithelzellen des bovinen Kolons *in situ* und *in vitro* keine Expression von Stx1-Rezeptoren nachweisen konnten (259).

Wahrscheinlich werden die Stx durch andere, Gb₃-unabhängige Mechanismen durch die Epithelzellschicht des bovinen Darmes transloziert. Zum einen könnte eine Resorption bei Schädigung der Epithelzellschicht erfolgen, wie sie nicht nur im Rahmen experimenteller STEC-Infektionen bei neugeborenen Kälbern (60) sondern auch durch andere Pathogene im Kälberalter unter Feldbedingungen hervorgerufen werden. Der Nachweis der Internalisierung und Prozessierung von Stx1 und Stx2 in Gb₃-negativen, humanen Kolonkarzinomzellen (248) weist zum anderen darauf hin, dass es bislang unbekannte Mechanismen der Stx-Aufnahme

auch bei bovinen intestinalen Epithelzellen, die keine Gb₃-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, geben könnte.

In vitro und *in vivo*-Untersuchungen zur Wirkung von Stx auf Zellen der bovinen adaptativen Immunität lassen vermuten, dass es bei STEC-Erstinfektionen von Kälbern zu einer Stx-vermittelten Unterdrückung der STEC-spezifischen zellulären Immunität kommt (161, 162, 165, 260). Dies wiederum könnte der Etablierung persistenter STEC-Infektionen beim Rind Vorschub leisten. Ein Einfluss Stx-spezifischer Antikörper auf die STEC-Ausscheidung konnte in der vorgelegten Studie nicht ermittelt werden. So war keine Korrelation zwischen der Höhe maternaler Stx-spezifischer Antikörper und der Dauer der STEC-Ausscheidung bei den Kälbern feststellbar. Allerdings muss in einer natürlich infizierten Herde, wie der hier untersuchten, von einer ständigen Re(infektion) der Tiere unter Beteiligung unterschiedlichster STEC-Stämme ausgegangen werden. Damit fehlt ein definiertes STEC-Infektionsereignis anhand dessen der mögliche Einfluss einer Stx-spezifischen Immunität auf die Dauer der Ausscheidung eines bestimmten Stammes überprüft werden könnte.

Die Erhöhung Stx1- und vor allem auch Stx2-spezifischer Serumantikörpertiter durch eine Stx-basierende Immunisierung junger Kälber könnte zwar die Aufnahme, Passage und Ausscheidung von STEC bei Rindern nicht völlig unterbinden. Durch die Entwicklung einer STEC-spezifischen zellulären Immunität unter dem Schutz Stx-spezifischer Immunglobuline könnte die Anzahl persistent infizierter Dauerausscheider und somit die STEC-Prävalenz in Rinderbeständen aber deutlich reduziert werden. Zwar schützen z.B. Immunisierungen mit Toxoidvakzinen auf Basis der Enterotoxine enterotoxischer *E. coli* (ETEC) Ferkel nur unzureichend gegen die durch die Toxine verursachten Durchfälle (171). Allerdings adhären ETEC unmittelbar an intestinale Epithelzellen, die gleichzeitig die Zielzellen für die Toxine darstellen. Nach Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche stören die Toxine die Ionensekretion und -absorption der Zellen (177). Vermutlich aufgrund der kurzen Diffusionsstrecke zwischen bakterieller Toxinsekretion und Rezeptorbindung ist die Neutralisation der Toxine durch Antikörper erschwert (193). Die Wirkung der Stx auf Zielzellen des Rindes vollzieht sich dagegen erst nach Resorption und Translokation bis zu den Immunzellen unterhalb des Darmepithels. Hier würden durch eine Impfung induzierte Serumantikörper effektiv wirken können. Eine Bekämpfungsstrategie auf der Basis des Stx ist nicht zuletzt deshalb vielversprechend, weil es sich bei Stx um einen allen STEC gemeinsamen Virulenzfaktor handelt.

VIII Zusammenfassung

Die Persistenz boviner Infektionen mit Stx-bildenden *E. coli* (STEC) wird wahrscheinlich durch die Bildung der Shigatoxine (Stx) begünstigt. Stx wirkt *in vitro* modulatorisch und supprimierend auf Zellen des mukosalen Immunsystems des Rindes und verzögert bei immunologisch naiven Kälbern die Ausbildung einer spezifischen zellulären Immunität nach STEC-Erstinfektion. Da bei Kühen im Serum und Kolostrum Stx-spezifische Antikörper nachweisbar sind, war es das Ziel der vorgelegten Arbeit, den Transfer kolostraler Stx-spezifischer Antikörper auf neugeborene Kälber sowie den Verlauf der humoralen Stx-Immunität in den ersten sechs Lebensmonaten der Tiere zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere überprüft werden, ob natürlich infizierte Kälber zum Zeitpunkt der STEC-Erstinfektion über Stx-spezifische Immunglobuline verfügen. Dazu wurden 33 Kühe sowie deren 35 neugeborene Kälber der Milchviehherde auf dem Lehr- und Versuchsgut der Justus-Liebig-Universität Gießen regelmäßig beprobt.

Die STEC-Ausscheidung wurde durch die Detektion von Stx-Genen (*stx*) im Kot mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Insgesamt konnte *stx* in 195 von 543 (35,91 %) Kälberkotproben nachgewiesen werden. Dabei fanden sich Gene ausschließlich für Stx1 in 33 (6,1 %), für Stx2 in 74 (13,6 %), sowie Gene beider Toxintypen in 88 (16,21 %) Proben. *Stx* konnte bei allen Kälbern, die wenigstens zehn Wochen lang beprobt wurden, mindestens einmal und an bis zu 11 aufeinander folgenden Zeitpunkten im Kot nachgewiesen werden.

Von 9 Kälbern mit regelmäßiger STEC-Ausscheidung wurden aus *stx*-positiven Kotproben 65 STEC-Stämme isoliert und auf das Vorhandensein der Gene für Stx1 (*stx1*), Stx2-Subtypen (*stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*), Intimin (*eae*) und EHEC-Hämolysin (*ehxA*) untersucht. Die Isolate wiesen 9 unterschiedliche Virulenzgen-Profile auf. Nach *Xba*I-Verdau der genomischen DNA sowie Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) konnten 60 Isolate 10 STEC-Klonen mit individuellem Makrorestriktionsmuster zugeordnet werden. In Adhäsionsversuchen mit primären bovinen Kolonzellen adhärierten repräsentative Stämme, zum Teil unter Ausbildung von „attaching und effacing“ (A/E)-Läsionen, an die Zellen und bildeten dabei Stx.

Der quantitative Nachweis neutralisierender, Stx-spezifischer Antikörper erfolgte mittels Verozell-Neutralisationstest. Stx1-spezifische Antikörper konnten in den Seren und Kolostren der untersuchten Muttertiere regelmäßig, aber in unterschiedlicher Höhe, nachgewiesen

werden. Kolostrale Stx1-spezifische Antikörper wurden effizient an neugeborene Kälber weitergegeben, bei denen die Antikörper im Serum detektiert werden konnten. Die Menge Stx1-spezifischer Serumantikörper sank bei allen Kälbern bereits innerhalb der ersten drei, in einem Fall innerhalb der ersten vier Lebenswochen in die Nähe der Nachweisgrenze ab. Stx1-spezifische Serumantikörper waren zum Ende des dritten Lebensmonats bei mehr als der Hälfte der untersuchten Kälber (14/23) nicht mehr nachweisbar. Bei 9 Tieren, die zu diesem Zeitpunkt noch einen Stx1Ak-Titer aufwiesen, war dieser, gemessen am Maximaltiter nach Kolostrumaufnahme, bis zu 17,0-fach reduziert. Mit Ausnahme von drei Kälbern sank bei allen untersuchten Tieren der Antikörpertiter innerhalb des Untersuchungszeitraumes an mindestens zwei aufeinander folgenden Entnahmezeitpunkten unter die Nachweisgrenze ab. Stx2-spezifische Antikörper waren lediglich bei 3 der untersuchten Muttertiere in Serum und Kolostrum sowie in Serumproben ihrer Jungtiere unmittelbar nach der Geburt und ausschließlich in niedrigen Titern nachweisbar.

Trotz der häufigen und zumeist lang anhaltenden Ausscheidung von *stx1*- und *stx2*-positiven STEC konnte eine Stx2-spezifische Serokonversion bei keinem, eine Stx1-spezifische Serokonversion bei nur 5 untersuchten Kälbern innerhalb der ersten sechs Lebensmonate nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von Kälber- und Muttertierseren im Immunoblot-Verfahren unter Verwendung von aufgereinigtem Stx1 konnten Stx1-spezifische Immunglobuline der Klassen IgG₁, IgG₂ und IgA nachgewiesen werden. Sie waren hauptsächlich gegen die A-Untereinheit von Stx1 gerichtet. StxB1-spezifische Immunglobuline fanden sich dagegen nur in der Hälfte der getesteten Muttertierseren sowie in den postkolostralen Seren ihrer neugeborenen Kälber, nicht aber in Seren von Kälbern, die älter als 19 Wochen waren.

Die erstmalige STEC-Infektion von Kälbern scheint demnach unter Feldbedingungen in einen Zeitraum zu fallen, in dem ein Großteil der Tiere nicht oder nur über geringe Mengen Stx-spezifischer Antikörper verfügt. Eine Immunisierungsstrategie auf der Basis des Stx könnte über die Erhöhung Stx1- insbesondere aber Stx2-spezifischer Antikörpertiter zum Schluss dieser immunologischen Lücke führen. Bovine Immunzellen wären dann zum Zeitpunkt der STEC-Erstinfektion vor den modulatorischen und supprimierenden Wirkungen des Stx geschützt. Unter diesen Voraussetzungen könnte sich unverzüglich eine Infektionsimmunität aufbauen, die die Persistenz der Infektion verhindert.

IX Summary

Persistent shedding of Stx-producing *E. coli* (STEC) in cattle is likely to be promoted by the production of Shiga toxins (Stx). Stx exhibit modulating and suppressive effects on bovine mucosal immune cells *in vitro*. Upon first STEC infection of hitherto immunological naïve calves, Stx suppress the onset of a specific cellular immune response. Since Stx-specific antibodies are frequently detectable in sera and colostrums of adult cattle, the aim of the present study was to assess the transfer efficacy of the maternal antibodies to newborn calves and the development of acquired Stx-specific humoral immune responses during the first months of age. Particular emphasis was put on the quantitation of Stx-specific immunoglobulins at the time of initial STEC infection. For that purpose, 33 conventional dairy cows and their 35 newborn calves from the local dairy farm of the Justus Liebig University Giessen were regularly sampled.

STEC shedding was investigated by detection of Stx-genes (*stx*) in the feces using polymerase chain reaction (PCR). *Stx* was detectable in 195 (35.91 %) of 543 fecal samples from calves. Genes for Stx1, Stx2, or both were detected in 33 (6.1 %), 74 (13.6 %), and 88 (16.21 %) fecal samples, respectively. In the feces of calves sampled for at least ten weeks, *stx* was detectable at least once and at up to 11 consecutive samplings.

From nine calves, that regularly shed STEC, *stx* positive fecal samples were selected for the isolation of STEC strains. Sixty-five STEC strains were obtained and further characterized for the possession of genes for Stx1 (*stx1*), Stx2-subtypes (*stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*), intimin (*eae*) and EHEC-hemolysin (*ehxA*). The isolates exhibited nine different virulence profiles. After *Xba*I digestion of the genomic DNA and pulsed field gel electrophoresis (PFGE), 60 strains were assigned to 10 distinct STEC clones characterized by individual macro restriction patterns. In following adhesion studies, representative STEC strains adhered to primary bovine colonic epithelial cells, partly causing “attaching and effacing” lesions, and produced Stx upon adhesion.

Neutralizing Stx1- and Stx2-specific antibodies were quantified by Vero-cell neutralization assay. Stx1-specific antibodies were regularly detectable in sera and colostrums of dams with high individual differences. Maternal Stx1-specific antibodies were efficiently transferred to the offspring as these antibodies were present in calves’ sera soon after colostrum uptake. The amount of Stx1-specific antibodies decreased during the first three, in one case four weeks, of

age to levels just above the detection limit. Stx1-specific antibody titers were below the detection limit in more than half of the calves (14/23) at the end of the 12th week. In nine calves possessing a Stx1-specific antibody titer at this age, the titer was reduced up to 17-fold compared to the maximum titer after colostrum uptake. With the exception of three calves, all other calves tested negative at at least two consecutive samplings.

Only low Stx2-specific titers were detectable in sera and colostrums of three dams and the post-colostral serum samples of the corresponding calves.

Despite frequent or prolonged shedding of both, *stx1*- and *stx2*-STEC, a Stx1-specific seroconversion was detectable in only five, a Stx2-specific seroconversion in none of the calves.

Stx1-specific immunoglobulins of classes IgG₁, IgG₂, and IgA were detectable in the sera of dams and calves via immunoblot deploying purified Stx1. Immunoglobulins were particularly specific for the A subunit of Stx1. StxB1 specific antibodies were only detectable in about half of the tested dam sera and post-colostral sera of corresponding calves but were not present in sera of calves older than 19 weeks of age.

In conclusion, the initial STEC infection of calves under field conditions appears to occur at an age, at which the majority of animals possesses no or only residual titers of Stx-specific antibodies. An immunization strategy based on Stx may close this immunological gap via an increase of Stx1- and particularly Stx2-specific antibodies. Thereupon, susceptible bovine immune cells would be protected from the immunomodulating and -suppressive effects of Stx when first experiencing STEC antigens. Considering this perception, an effective immune response would develop preventing persistent STEC infections in cattle.

X Literaturverzeichnis

1. **Abu-Median, A. B., P. M. van Diemen, F. Dziva, I. Vlisidou, T. S. Wallis, and M. P. Stevens.** 2006. Functional analysis of lymphostatin homologues in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **258**:43-9.
2. **Adu-Bobie, J., G. Frankel, C. Bain, A. G. Goncalves, L. R. Trabulsi, G. Douce, S. Knutton, and G. Dougan.** 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* **36**:662-8.
3. **Aidar-Ugrinovich, L., J. Blanco, M. Blanco, J. E. Blanco, L. Leomil, G. Dahbi, A. Mora, D. L. Onuma, W. D. Silveira, and A. F. Pestana de Castro.** 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* **115**:297-306.
4. **Armstrong, G. D., E. Fodor, and R. Vanmaele.** 1991. Investigation of Shiga-like toxin binding to chemically synthesized oligosaccharide sequences. *J Infect Dis* **164**:1160-7.
5. **Asakura, H., S. Makino, H. Kobori, M. Watarai, T. Shirahata, T. Ikeda, and K. Takeshi.** 2001. Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (stx) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals. *Epidemiol Infect* **127**:27-36.
6. **Ball, H. J., D. Finlay, L. Burns, and D. P. Mackie.** 1994. Application of monoclonal antibody-based sandwich ELISAs to detect verotoxins in cattle faeces. *Res Vet Sci* **57**:225-32.
7. **Banks, K. L.** 1982. Host defense in the newborn animal. *J Am Vet Med Assoc* **181**:1053-6.
8. **Barth, S.** 2003. Untersuchung zur immunologischen Bedeutung des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica*. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
9. **Barth, S., A. Tscholshiew, G. Vallejo, and R. Bauerfeind.** 2003. Characterization of Shigatoxin-encoding *Escherichia coli* (STEC) isolates from pigs in Germany., p. 421, *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 293 (Suppl. No. 36):
10. **Bender, P.** 2004. Bestimmung von Immunglobulin G und Immunglobulin M im Serum neugeborener Kälber während der ersten zehn Lebenstage unter besonderer Berücksichtigung der Darmgesundheit der Probanden sowie im Kolostrum derer Mütter mittels zweier neuartiger ELISAs. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
11. **Bertin, Y., K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli, and C. Martin.** 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* **39**:3060-5.
12. **Besser, T. E., C. C. Gay, and L. Pritchett.** 1991. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* **198**:419-22.
13. **Besser, T. E., T. C. McGuire, C. C. Gay, and L. C. Pritchett.** 1988. Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves. *J Virol* **62**:2234-7.

14. **Besser, T. E., B. L. Richards, D. H. Rice, and D. D. Hancock.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect* **127**:555-60.
15. **Beutin, L.** 2006. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**:299-305.
16. **Beutin, L., D. Geier, H. Steinrück, S. Zimmermann, and F. Scheutz.** 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* **31**:2483-8.
17. **Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, S. Aleksic, H. A. Gillespie, and T. S. Whittam.** 1997. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol* **63**:2175-80.
18. **Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* **42**:1099-108.
19. **Beutin, L., H. Steinrück, G. Krause, K. Steege, S. Haby, G. Hultsch, and B. Appel.** 2007. Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J Appl Microbiol* **102**:630-9.
20. **Blanco, J. E., M. Blanco, M. P. Alonso, A. Mora, G. Dahbi, M. A. Coira, and J. Blanco.** 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* **42**:311-9.
21. **Blanco, M., J. Blanco, J. E. Blanco, and J. Ramos.** 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am J Vet Res* **54**:1446-51.
22. **Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, E. A. Gonzalez, M. P. Alonso, H. Maas, and W. H. Jansen.** 1996. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur J Epidemiol* **12**:13-9.
23. **Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, E. A. Gonzalez, A. Mora, C. Prado, L. Fernandez, M. Rio, J. Ramos, and M. P. Alonso.** 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol Infect* **117**:251-7.
24. **Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, A. Mora, C. Prado, M. P. Alonso, M. Mourino, C. Madrid, C. Balsalobre, and A. Juarez.** 1997. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet Microbiol* **54**:309-19.
25. **Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, M. P. Alonso, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardez, and J. Blanco.** 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *J Clin Microbiol* **42**:645-51.
26. **Blanco, M., N. L. Padola, A. Krüger, M. E. Sanz, J. E. Blanco, E. A. Gonzalez, G. Dahbi, A. Mora, M. I. Bernardez, A. I. Etcheverria, G. H. Arroyo, P. M. Lucchesi, A. E. Parma, and J. Blanco.** 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* **7**:269-76.
27. **Blanco, M., S. Schumacher, T. Tasara, C. Zweifel, J. E. Blanco, G. Dahbi, J. Blanco, and R. Stephan.** 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors

- of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta2*). BMC Microbiol **5**:23.
28. **Bockemühl J., H. Karch und H. Tschäpe.** 1997. Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundheitsbl. **40**:194-197.
29. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, and C. L. Gyles.** 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J Clin Microbiol **37**:497-503.
30. **Bohle, S.** 2006. Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung des Virulenzfaktors "Intimin" von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* beim Rind. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
31. **Borman-Eby, H.C., S. A. McEwen, R. C. Clarke, W. B. McNab, K. Rahn, and A. Valdivieso-Garcia.** 1993. The seroprevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in Ontario dairy cows and associations with production and management. Prev. Vet. Med. **15**:261-274.
32. **Bosworth, B. T., and T. A. Casey.** 1997. Presented at the 97th General meeting of the American Society for Microbiology. 4.-8. May 1997, Miami Beach, U.S.A., 4.-8.May 1997.
33. **Boyd, J. W., and A. J. Boyd.** 1987. Computer model of the absorption and distribution of colostral immunoglobulins in the newborn calf. Res Vet Sci **43**:291-6.
34. **Brandon, M. R., and A. K. Lascelles.** 1971. Relative efficiency of absorption of IgG 1, IgG 2, IgA and IgM in the newborn calf. Aust J Exp Biol Med Sci **49**:629-33.
35. **Brandon, M. R., D. L. Watson, and A. K. Lascelles.** 1971. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. Aust J Exp Biol Med Sci **49**:613-23.
36. **Bretschneider, G., E. M. Berberov, and R. A. Moxley.** 2007. Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. Vet Immunol Immunopathol **118**:229-38.
37. **Brett, K. N., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 2003. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2*-EDL933 and/or *stx2vhb* subtypes. J Clin Microbiol **41**:2716-22.
38. **Brown, C. A., B. G. Harmon, T. Zhao, and M. P. Doyle.** 1997. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. Appl Environ Microbiol **63**:27-32.
39. **Buchko, S. J., R. A. Holley, W. O. Olson, V. P. Gannon, and D. M. Veira.** 2000. The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. J Food Prot **63**:1467-74.
40. **Bülte, M.** 2001. [Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* types (VTEC) from different sources]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **114**:473-7.
41. **Bürk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bülte, and E. Martlbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. J Clin Microbiol **41**:2106-12.
42. **Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner.** 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Res **26**:4196-204.
43. **Butler, J. E.** 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet Immunol Immunopathol **4**:43-152.

44. **Caprioli, A., I. Luzzi, L. Seganti, M. Marchetti, M.A. Karmali, I. Clarke and B. Boyd.** 1994. Frequency and nature of verocytotoxin 2 (VT2) neutralizing activity (NA) in human and animal sera, p. 353-356. In M. A. Karmali (ed.), Recent advances in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Sciences, Amsterdam
45. **Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugereb, and E. Oswald.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* **36**:289-311.
46. **Chanter, N., G. A. Hall, A. P. Bland, A. J. Hayle, and K. R. Parsons.** 1986. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). *Vet Microbiol* **12**:241-53.
47. **Cho, S., F. Diez-Gonzalez, C. P. Fossler, S. J. Wells, C. W. Hedberg, J. B. Kaneene, P. L. Ruegg, L. D. Warnick, and J. B. Bender.** 2006. Prevalence of shiga toxin-encoding bacteria and shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from dairy farms and county fairs. *Vet Microbiol* **118**:289-98.
48. **Clover, C. K., and A. Zarkower.** 1980. Immunologic responses in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. *Am J Vet Res* **41**:1002-7.
49. **Cobbold, R., and P. Desmarchelier.** 2000. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol* **71**:125-37.
50. **Cobbold, R., and P. Desmarchelier.** 2001. Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Vet Microbiol* **79**:323-35.
51. **Cobbold, R., and P. Desmarchelier.** 2002. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Appl Environ Microbiol* **68**:4148-52.
52. **Cobeljic, M., B. Dimic, D. Opacic, Z. Lepsanovic, V. Stojanovic, and S. Lazic.** 2005. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. *Epidemiol Infect* **133**:359-66.
53. **Cookson, A. L., and M. J. Woodward.** 2003. The role of intimin in the adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7 to HEp-2 tissue culture cells and to bovine gut explant tissues. *Int J Med Microbiol* **292**:547-53.
54. **Cornick, N. A., S. L. Booher, and H. W. Moon.** 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun* **70**:2704-7.
55. **Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe.** 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology* **13**:95-99.
56. **Cray, W. C., Jr., and H. W. Moon.** 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **61**:1586-90.
57. **Cristancho, L., R. P. Johnson, S. A. McEwen, and C. L. Gyles.** 2007. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* in white veal calves. *Vet Microbiol*.
58. **De Grandis, S., J. Ginsberg, M. Toone, S. Climie, J. Friesen, and J. Brunton.** 1987. Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J Bacteriol* **169**:4313-9.
59. **Dean-Nystrom, E. A.** 2006. National Animal Disease Center Ames, Iowa, persönliche Mitteilung.
60. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, W. C. Cray, Jr., and H. W. Moon.** 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* **65**:1842-8.

61. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, and H. W. Moon.** 1999. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 in weaned calves. *Adv Exp Med Biol* **473**:173-7.
62. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, H. W. Moon, and A. D. O'Brien.** 1998. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect Immun* **66**:4560-3.
63. **Dorn, C. R., D. H. Francis, E. J. Angrick, J. A. Willgohs, R. A. Wilson, J. E. Collins, B. H. Jenke, and S. J. Shawd.** 1993. Characteristics of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. *Vet Microbiol* **36**:149-59.
64. **Douglas, V. L., J. S. Cullor, J. W. Tyler, M. C. Thurmond, and R. B. Bushnell.** 1989. Rapid decay of serum IgG recognizing gram-negative cell wall core antigens in neonatal calves. *Am J Vet Res* **50**:1138-40.
65. **Downes, F. P., T. J. Barrett, J. H. Green, C. H. Aloisio, J. S. Spika, N. A. Strockbine, and I. K. Wachsmuth.** 1988. Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun* **56**:1926-33.
66. **Dziva, F., I. Vlisidou, V. F. Crepin, T. S. Wallis, G. Frankel, and M. P. Stevens.** 2007. Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Vet Microbiol* **123**:254-61.
67. **Eigenmann, U. J., W. Zaremba, K. Luetgebrune, and E. Grunert.** 1983. [Colostrum intake and immunoglobulin absorption by calves with and without birth acidosis]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **96**:109-13.
68. **Endsley, J. J., J. A. Roth, J. Ridpath, and J. Neill.** 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* **31**:123-5.
69. **Erpenstein, C.** 1996. Klassifizierung boviner Shiga-like-Toxin-bildender *Escherichia coli*-Stämme anhand unterschiedlicher Adhäsionsmerkmale. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
70. **Faith, N. G., J. A. Shere, R. Brosch, K. W. Arnold, S. E. Ansay, M. S. Lee, J. B. Luchansky, and C. W. Kaspar.** 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **62**:1519-25.
71. **Fegan, N., P. Vanderlinde, G. Higgs, and P. Desmarchelier.** 2004. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* **97**:362-70.
72. **Fischer, H., P. Ellstrom, K. Ekstrom, L. Gustafsson, M. Gustafsson, and C. Svanborg.** 2007. Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. *Cell Microbiol* **9**:1239-51.
73. **Föllmann, W., S. Weber, and S. Birkner.** 2000. Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicol In Vitro* **14**:435-45.
74. **Franck, S. M., B. T. Bosworth, and H. W. Moon.** 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol* **36**:1795-7.
75. **Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton.** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**:911-21.
76. **Frankel, G., A. D. Phillips, L. R. Trabulsi, S. Knutton, G. Dougan, and S. Matthews.** 2001. Intimin and the host cell--is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol* **9**:214-8.

-
77. **Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch.** 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**:74-84.
78. **Fuchs, S., I. Mühldorfer, A. Donohue-Rolfe, M. Kerenyi, L. Emody, R. Alexiev, P. Nenkoy, and J. Hacker.** 1999. Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb Pathog* **27**:13-23.
79. **Gannon, V. P., C. Teerling, S. A. Masri, and C. L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol* **136**:1125-35.
80. **Garber, L. P., S. J. Wells, D. D. Hancock, M. P. Doyle, J. Tuttle, J. A. Shere, and T. Zhao.** 1995. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* **207**:46-9.
81. **Garcia-Aljaro, C., M. Muniesa, J. Jofre, and A. R. Blanch.** 2006. Newly identified bacteriophages carrying the stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. *FEMS Microbiol Lett* **258**:127-35.
82. **Gentry, M. K., and J. M. Dalrymple.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J Clin Microbiol* **12**:361-6.
83. **Geue, L., M. Segura-Alvarez, F. J. Conraths, T. Kuczius, J. Bockemühl, H. Karch, and P. Gallien.** 2002. A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol Infect* **129**:173-85.
84. **Gobius, K. S., G. M. Higgs, and P. M. Desmarchelier.** 2003. Presence of activatable Shiga toxin genotype (stx(2d)) in Shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. *J Clin Microbiol* **41**:3777-83.
85. **Grauke, L. J., I. T. Kudva, J. W. Yoon, C. W. Hunt, C. J. Williams, and C. J. Hovde.** 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol* **68**:2269-77.
86. **Griffin, P. M., and R. V. Tauxe.** 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**:60-98.
87. **Gunning, R. F., A. D. Wales, G. R. Pearson, E. Done, A. L. Cookson, and M. J. Woodward.** 2001. Attaching and effacing lesions in the intestines of two calves associated with natural infection with *Escherichia coli* O26:H11. *Vet Rec* **148**:780-2.
88. **Gunzburg, S. T., V. Burke, and K. A. Bettelheim.** 1990. HEp-2 cell adherence and Vero cell cytotoxin production by EPEC strains isolated from children with diarrhoea in New Zealand. *FEMS Microbiol Lett* **57**:181-5.
89. **Hancock, D., T. Besser, J. Lejeune, M. Davis, and D. Rice.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* **66**:71-8.
90. **Hancock, D. D., T. E. Besser, M. L. Kinsel, P. I. Tarr, D. H. Rice, and M. G. Paros.** 1994. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect* **113**:199-207.
91. **Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, D. E. Herriott, and P. I. Tarr.** 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* **118**:193-5.
92. **Harmon, B. G., C. A. Brown, S. Tkalcic, P. O. Mueller, A. Parks, A. V. Jain, T. Zhao, and M. P. Doyle.** 1999. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J Food Prot* **62**:574-9.
93. **Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T.**

- Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**:11-22.
94. Head, S. C., M. A. Karmali, and C. A. Lingwood. 1991. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of a subunit function. *J Biol Chem* **266**:3617-21.
95. Head, S. C., M. A. Karmali, M. E. Roscoe, M. Petric, N. A. Strockbine, and I. K. Wachsmuth. 1988. Serological differences between verocytotoxin 2 and shiga-like toxin II. *Lancet* **2**:751.
96. Herold, S., H. Karch, and H. Schmidt. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int J Med Microbiol* **294**:115-21.
97. Heuvelink, A. E., F. L. van den Biggelaar, J. Zwartkruis-Nahuis, R. G. Herbes, R. Huyben, N. Nagelkerke, W. J. Melchers, L. A. Monnens, and E. de Boer. 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J Clin Microbiol* **36**:3480-7.
98. Hodgins, D. C., and P. E. Shewen. 2000. Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves against *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res* **64**:3-8.
99. Hoey, D. E., C. Currie, R. W. Else, A. Nutikka, C. A. Lingwood, D. L. Gally, and D. G. Smith. 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J Med Microbiol* **51**:143-9.
100. Hoey, D. E., L. Sharp, C. Currie, C. A. Lingwood, D. L. Gally, and D. G. Smith. 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell Microbiol* **5**:85-97.
101. Hoffman, M. A., C. Menge, T. A. Casey, W. Laegreid, B. T. Bosworth, and E. A. Dean-Nystrom. 2006. Bovine immune response to shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clin Vaccine Immunol* **13**:1322-7.
102. Holland, R. E., R. A. Wilson, M. S. Holland, V. Yuzbasiyan-Gurkan, T. P. Mullaney, and D. G. White. 1999. Characterization of *eae*+ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Vet Microbiol* **66**:251-63.
103. Hornitzky, M. A., K. Mercieca, K. A. Bettelheim, and S. P. Djordjevic. 2005. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. *Appl Environ Microbiol* **71**:3405-12.
104. Husband, A. J., M. R. Brandon, and A. K. Lascelles. 1972. Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. *Aust J Exp Biol Med Sci* **50**:491-8.
105. Husband, A. J., and A. K. Lascelles. 1975. Antibody responses to neonatal immunisation in calves. *Res Vet Sci* **18**:201-7.
106. Hyatt, D. R., J. C. Galland, and J. R. Gillespie. 2001. Usefulness of a commercially available enzyme immunoassay for Shiga-like toxins I and II as a presumptive test for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces. *J Vet Diagn Invest* **13**:71-3.
107. Irino, K., M. A. Kato, T. M. Vaz, Ramos, II, M. A. Souza, A. S. Cruz, T. A. Gomes, M. A. Vieira, and B. E. Guth. 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Vet Microbiol* **105**:29-36.
108. Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog* **8**:47-60.

-
109. **Itoh, K., T. Tezuka, K. Inoue, H. Tada, and T. Suzuki.** 2001. Different binding property of verotoxin-1 and verotoxin-2 against their glycolipid receptor, globotriaosylceramide. *Tohoku J Exp Med* **195**:237-43.
110. **Jackson, M. P., J. W. Newland, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1987. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **2**:147-53.
111. **James, S. P., and J. M. Klapproth.** 1996. Major pathways of mucosal immunity and inflammation: cell activation, cytokine production and the role of bacterial factors. *Aliment Pharmacol Ther* **10 Suppl 2**:1-9.
112. **Janka, A., M. Bielaszewska, U. Dobrindt, and H. Karch.** 2002. Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (efal) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: H. *Int J Med Microbiol* **292**:207-14.
113. **Janke, B. H., D. H. Francis, J. E. Collins, M. C. Libal, D. H. Zeman, and D. D. Johnson.** 1989. Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest* **1**:6-11.
114. **Janke, B. H., D. H. Francis, J. E. Collins, M. C. Libal, D. H. Zeman, D. D. Johnson, and R. D. Neiger.** 1990. Attaching and effacing *Escherichia coli* infection as a cause of diarrhea in young calves. *J Am Vet Med Assoc* **196**:897-901.
115. **Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:7839-43.
116. **Johnson, R. P., W. C. Cray, Jr., and S. T. Johnson.** 1996. Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**:1879-83.
117. **Jonsson, M. E., A. Aspan, E. Eriksson, and I. Vagsholm.** 2001. Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd. *Int J Food Microbiol* **66**:55-61.
118. **Kaper J.B.; Elliot S.; Sperandio V.; Perna N.T.; Mayhew G.F.; Blattner F.R.** 1998. Attaching and effacing intestinal histopathologie and the locus of enterocyte effacement. p. 163-182. In O. B. A. D. Kaper J.B. (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E.coli* strains. ASM Press, Washington, DC
119. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-40.
120. **Karch, H., H. Bohm, H. Schmidt, F. Gunzer, S. Aleksic, and J. Heesemann.** 1993. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H. *J Clin Microbiol* **31**:1200-5.
121. **Karmali, M. A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **2**:15-38.
122. **Kim, J. W., and F. W. Schmidt.** 1983. [Absorption of colostral immunoglobulins by the calf]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **90**:283-6.
123. **Kimman, T. G., F. Westenbrink, B. E. Schreuder, and P. J. Straver.** 1987. Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J Clin Microbiol* **25**:1097-106.
124. **Kimura, T., S. Tani, Y. Matsumoto Yi, and T. Takeda.** 2001. Serum amyloid P component is the Shiga toxin 2-neutralizing factor in human blood. *J Biol Chem* **276**:41576-9.

125. **Klapproth, J. M., M. S. Donnenberg, J. M. Abraham, and S. P. James.** 1996. Products of enteropathogenic *E. coli* inhibit lymphokine production by gastrointestinal lymphocytes. *Am J Physiol* **271**:G841-8.
126. **Klapproth, J. M., I. C. Scaletsky, B. P. McNamara, L. C. Lai, C. Malstrom, S. P. James, and M. S. Donnenberg.** 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun* **68**:2148-55.
127. **Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish.** 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1290-8.
128. **Kobayashi, H., J. Shimada, M. Nakazawa, T. Morozumi, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen, and K. Yamamoto.** 2001. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol* **67**:484-9.
129. **Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**:775-9.
130. **Kozlov Yu, V., A. A. Kabishev, E. V. Lukyanov, and A. A. Bayev.** 1988. The primary structure of the operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperature phage H30 shiga-like toxin. *Gene* **67**:213-21.
131. **Kudva, I. T., P. G. Hatfield, and C. J. Hovde.** 1997. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol* **35**:892-9.
132. **Kuribayashi, T., T. Seita, M. Fukuyama, K. Furuhashi, M. Honda, M. Matsumoto, H. Seguchi, and S. Yamamoto.** 2006. Neutralizing activity of bovine colostral antibody against verotoxin derived from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *J Infect Chemother* **12**:251-6.
133. **Lack, P.** 2006. Bestimmung von Immunglobulin G und M im Serum neugeborener Kälber während der ersten zehn Lebensstage unter besonderer Berücksichtigung des Fütterungsregimes. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
134. **Laegreid, W. W., R. O. Elder, and J. E. Keen.** 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. *Epidemiol Infect* **123**:291-8.
135. **Laegreid, W. W., and J. E. Keen.** 2004. Estimation of the basic reproduction ratio (R0) for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 (STEC O157) in beef calves. *Epidemiol Infect* **132**:291-5.
136. **Lahti, E., O. Ruoho, L. Rantala, M. L. Hanninen, and T. Honkanen-Buzalski.** 2003. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit. *Appl Environ Microbiol* **69**:554-61.
137. **Lambrecht, G., H. Frerking, and E. Henkel.** 1982. [Determination of IgG, IgA and IgM in colostrum of cattle by nephelometry and radial immunodiffusion tests with particular consideration of season, lactation and genetics (author's transl)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **89**:107-10.
138. **Leomil, L., L. Aidar-Ugrinovich, B. E. Guth, K. Irino, M. P. Vettorato, D. L. Onuma, and A. F. de Castro.** 2003. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet Microbiol* **97**:103-9.
139. **Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, and W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**:7549-53.

140. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-89.
141. **Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick, C. R. Young, and S. Sotman.** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119-22.
142. **Liebisch, B., and S. Schwarz.** 1996. Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar dublin. *J Clin Microbiol* **34**:641-6.
143. **Lingwood, C. A.** 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol* **4**:147-53.
144. **Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali.** 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**:8834-9.
145. **Logan, E. F., D. G. McBeath, and B. G. Lowman.** 1974. Quantitative studies on serum immunoglobulin levels in suckled calves from birth to five weeks. *Vet Rec* **94**:367-70.
146. **Logan, E. F., W. J. Penhale, and R. A. Jones.** 1973. Changes in the serum immunoglobulin levels of colostrum-fed calves during the first 12 weeks postpartum. *Res Vet Sci* **14**:394-7.
147. **Low, J. C., I. J. McKendrick, C. McKechnie, D. Fenlon, S. W. Naylor, C. Currie, D. G. Smith, L. Allison, and D. L. Gally.** 2005. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Appl Environ Microbiol* **71**:93-7.
148. **Maidhof, H., B. Guerra, S. Abbas, H. M. Elsheikha, T. S. Whittam, and L. Beutin.** 2002. A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. *Appl Environ Microbiol* **68**:5834-42.
149. **Mainil, J. G., and G. Daube.** 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* **98**:1332-44.
150. **Mainil, J. G., C. J. Duchesnes, S. C. Whipp, L. R. Marques, A. D. O'Brien, T. A. Casey, and H. W. Moon.** 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am J Vet Res* **48**:743-8.
151. **Mainil, J. G., E. R. Jacquemin, A. E. Kaeckenbeeck, and P. H. Pohl.** 1993. Association between the effacing (*eae*) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* **54**:1064-8.
152. **Makino, K., K. Ishii, T. Yasunaga, M. Hattori, K. Yokoyama, C. H. Yutsudo, Y. Kubota, Y. Yamaichi, T. Iida, K. Yamamoto, T. Honda, C. G. Han, E. Ohtsubo, M. Kasamatsu, T. Hayashi, S. Kuhara, and H. Shinagawa.** 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res* **5**:1-9.
153. **Malstrom, C., and S. James.** 1998. Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. *Infect Immun* **66**:3120-7.
154. **Matthews, L., J. C. Low, D. L. Gally, M. C. Pearce, D. J. Mellor, J. A. Heesterbeek, M. Chase-Topping, S. W. Naylor, D. J. Shaw, S. W. Reid, G. J. Gunn, and M. E. Woolhouse.** 2006. Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:547-52.
155. **Matthews, L., I. J. McKendrick, H. Ternent, G. J. Gunn, B. Synge, and M. E. Woolhouse.** 2006. Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiol Infect* **134**:131-42.

156. **McNeilly, T. N., S. W. Naylor, M. C. Mitchell, S. McAteer, A. Mahajan, D. G. Smith, D. L. Gally, J. C. Low, and J. F. Huntley.** 2007. Simple methods for measurement of bovine mucosal antibody responses in vivo. *Vet Immunol Immunopathol* **118**:160-7.
157. **Melton-Celsa A.R., and A. D. O'Brien.** 1998. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals, p. 121-128. In O'Brien A.D. and J. B. Kaper (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E.coli* strains. American Society for Microbiology, Washington, DC
158. **Melton-Celsa, A. R., S. C. Darnell, and A. D. O'Brien.** 1996. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* **64**:1569-76.
159. **Melton-Celsa, A. R., J. F. Kokai-Kun, and A. D. O'Brien.** 2002. Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A2 peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Mol Microbiol* **43**:207-15.
160. **Melton-Celsa, A. R., J. E. Rogers, C. K. Schmitt, S. C. Darnell, and A. D. O'Brien.** 1998. Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain. *Jpn J Med Sci Biol* **51 Suppl**:S108-14.
161. **Menge, C.** 2003. Protocols to study effects of Shiga toxin on mononuclear leukocytes. *Methods Mol Med* **73**:275-89.
162. **Menge, C.** 2006. Immunomodulatorische Wirkung und pathogenetische Bedeutung der *Escherichia coli* Shigatoxine beim Rind. Habilitationsschrift. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
163. **Menge, C., M. Blessenohl, T. Eisenberg, I. Stamm, and G. Baljer.** 2004. Bovine Ileal Intraepithelial Lymphocytes Represent Target Cells for Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**:1896-905.
164. **Menge, C., I. Stamm, P. M. Van Diemen, P. Sopp, G. Baljer, T. S. Wallis, and M. P. Stevens.** 2004. Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *J Med Microbiol* **53**:573-9.
165. **Menge, C., L. H. Wieler, T. Schlapp, and G. Baljer.** 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. *Infect Immun* **67**:2209-17.
166. **Mercado, E. C., A. Gioffre, S. M. Rodriguez, A. Cataldi, K. Irino, A. M. Elizondo, A. L. Cipolla, M. I. Romano, R. Malena, and M. A. Mendez.** 2004. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:82-8.
167. **Meyer-Broseta, S., S. N. Bastian, P. D. Arne, O. Cerf, and M. Sanaa.** 2001. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health* **203**:347-61.
168. **Meyer, T., H. Karch, J. Hacker, H. Bocklage, and J. Heesemann.** 1992. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. *Zentralbl Bakteriol* **276**:176-88.
169. **Molla, A.** 1978. Immunoglobulin levels in calves fed colostrum by stomach tube. *Vet Rec* **103**:377-80.
170. **Montenegro, M. A., M. Bulte, T. Trumpf, S. Aleksic, G. Reuter, E. Bulling, and R. Helmuth.** 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J Clin Microbiol* **28**:1417-21.

171. **Moon, H. W., A. L. Baetz, and R. A. Giannella.** 1983. Immunization of swine with heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin coupled to a carrier protein does not protect suckling pigs against an *Escherichia coli* strain that produces heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **39**:990-2.
172. **Moussay, E., I. Stamm, A. Taubert, G. Baljer, and C. Menge.** 2006. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **113**:367-82.
173. **Moxley, R. A., and D. H. Francis.** 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* **53**:339-46.
174. **Mühldorfer, I., J. Hacker, G. T. Keusch, D. W. Acheson, H. Tschäpe, A. V. Kane, A. Ritter, T. Olschlager, and A. Donohue-Rolfe.** 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **64**:495-502.
175. **Nakajima, H., N. Kiyokawa, Y. U. Katagiri, T. Taguchi, T. Suzuki, T. Sekino, K. Mimori, T. Ebata, M. Saito, H. Nakao, T. Takeda, and J. Fujimoto.** 2001. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **276**:42915-22.
176. **Nakao, H., K. Kimura, H. Murakami, T. Maruyama, and T. Takeda.** 2002. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**:289-97.
177. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
178. **Naylor, S. W., A. Flockhart, P. Nart, D. G. Smith, J. Huntley, D. L. Gally, and J. C. Low.** 2007. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves is reduced by prior colonization with the homologous strain. *Appl Environ Microbiol* **73**:3765-7.
179. **Naylor, S. W., D. L. Gally, and J. C. Low.** 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**:419-41.
180. **Naylor, S. W., J. C. Low, T. E. Besser, A. Mahajan, G. J. Gunn, M. C. Pearce, I. J. McKendrick, D. G. Smith, and D. L. Gally.** 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun* **71**:1505-12.
181. **Neely, M. N., and D. I. Friedman.** 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol* **28**:1255-67.
182. **Newburg, D. S., S. Ashkenazi, and T. G. Cleary.** 1992. Human milk contains the Shiga toxin and Shiga-like toxin receptor glycolipid Gb3. *J Infect Dis* **166**:832-6.
183. **Nguyen, T. V., P. Le Van, C. Le Huy, K. N. Gia, and A. Weintraub.** 2005. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* **43**:755-60.
184. **Nicholls, L., T. H. Grant, and R. M. Robins-Browne.** 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**:275-88.
185. **Norcross, N. L.** 1982. Secretion and composition of colostrum and milk. *J Am Vet Med Assoc* **181**:1057-60.
186. **Norman, L. M., W. D. Hohenboken, and K. W. Kelley.** 1981. Genetic differences in concentration of immunoglobulins G1 and M in serum and colostrum of cows and in serum of neonatal calves. *J Anim Sci* **53**:1465-72.
187. **O'Brien, A. D., M. E. Chen, R. K. Holmes, J. Kaper, and M. M. Levine.** 1984. Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet* **1**:77-8.

188. **O'Brien, A. D., and R. K. Holmes.** 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* **51**:206-20.
189. **O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson, and S. B. Formal.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**:763-9.
190. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **180**:65-94.
191. **O'Brien, A. D., T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, and S. B. Formal.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**:702.
192. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action and role in pathogenesis, p. 66-94. In P. J. Sansonetti (ed.), *Pathogenesis of Shigellosis*. Springer-Verlag KG, Germany, Berlin-Heidelberg.
193. **Ofek, I., D. Zafriri, J. Goldhar, and B. I. Eisenstein.** 1990. Inability of toxin inhibitors to neutralize enhanced toxicity caused by bacteria adherent to tissue culture cells. *Infect Immun* **58**:3737-42.
194. **Ogden, I. D., M. MacRae, and N. J. Strachan.** 2004. Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiol Lett* **233**:297-300.
195. **Ohya, T., and H. Ito.** 1999. Experimental infection of calves with *Escherichia coli* O157:H7. *J Vet Med Sci* **61**:1187-9.
196. **Olsnes, S., R. Reisbig, and K. Eiklid.** 1981. Subunit structure of *Shigella* cytotoxin. *J Biol Chem* **256**:8732-8.
197. **Omisakin, F., M. MacRae, I. D. Ogden, and N. J. Strachan.** 2003. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol* **69**:2444-7.
198. **Orden, J. A., J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, D. Cid, S. Garcia, R. Sanz, and R. de la Fuente.** 1998. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. *Vet Microbiol* **63**:239-48.
199. **Orskov, F., I. Orskov, and J. A. Villar.** 1987. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* **2**:276.
200. **Orth, D., K. Grif, M. P. Dierich, and R. Würzner.** 2006. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: indications for an animal reservoir. *Epidemiol Infect* **134**:719-23.
201. **Osburn, B. I., N. J. MacLachlan, and T. G. Terrell.** 1982. Ontogeny of the immune system. *J Am Vet Med Assoc* **181**:1049-52.
202. **Osek, J., P. Gallien, and D. Protz.** 2000. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **23**:267-76.
203. **Ostroff, S. M., P. I. Tarr, M. A. Neill, J. H. Lewis, N. Hargrett-Bean, and J. M. Kobayashi.** 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* **160**:994-8.
204. **Oswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marches, and A. Caprioli.** 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**:64-71.

-
205. **Paton, A. W., L. Beutin, and J. C. Paton.** 1995. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* **153**:71-4.
206. **Paton, A. W., and J. C. Paton.** 1996. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**:463-5.
207. **Paton, A. W., and J. C. Paton.** 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* **36**:598-602.
208. **Paton, A. W., J. C. Paton, P. N. Goldwater, M. W. Heuzenroeder, and P. A. Manning.** 1993. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-I operon of *Escherichia coli* O111:H. *Gene* **129**:87-92.
209. **Paton, A. W., J. C. Paton, M. W. Heuzenroeder, P. N. Goldwater, and P. A. Manning.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microb Pathog* **13**:225-36.
210. **Paton, A. W., J. C. Paton, and P. A. Manning.** 1993. Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. *Microb Pathog* **15**:77-82.
211. **Paton, A. W., M. C. Woodrow, R. M. Doyle, J. A. Lanser, and J. C. Paton.** 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **37**:3357-61.
212. **Paton, J. C., and A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**:450-79.
213. **Pearce, M. C., C. Jenkins, L. Vali, A. W. Smith, H. I. Knight, T. Cheasty, H. R. Smith, G. J. Gunn, M. E. Woolhouse, S. G. Amyes, and G. Frankel.** 2004. Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. *Appl Environ Microbiol* **70**:1708-16.
214. **Perera, L. P., L. R. Marques, and A. D. O'Brien.** 1988. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **26**:2127-31.
215. **Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**:529-33.
216. **Pierard, D., L. Huyghens, S. Lauwers, and H. Lior.** 1991. Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* **338**:762.
217. **Pierard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **36**:3317-22.
218. **Pierard, D., D. Stevens, L. Moriau, H. Lior, and S. Lauwers.** 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin Microbiol Infect* **3**:531-540.
219. **Pierce, A. E., and A. Feinstein.** 1965. Biophysical And Immunological Studies On Bovine Immune Globulins With Evidence For Selective Transport Within The Mammary Gland From Maternal Plasma To Colostrum. *Immunology* **8**:106-23.

-
220. **Pirro, F., L. H. Wieler, K. Failing, R. Bauerfeind, and G. Baljer.** 1995. Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle. *Vet Microbiol* **43**:131-41.
221. **Porter, P.** 1971. Immunoglobulin IgA in bovine mammary secretions and serum of the neonatal calf. *Biochim Biophys Acta* **236**:664-74.
222. **Potter, A. A., S. Klashinsky, Y. Li, E. Frey, H. Townsend, D. Rogan, G. Erickson, S. Hinkley, T. Klopfenstein, R. A. Moxley, D. R. Smith, and B. B. Finlay.** 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* **22**:362-9.
223. **Puente, R., L. A. Garcia-Pardo, and P. Hueso.** 1992. Gangliosides in bovine milk. Changes in content and distribution of individual ganglioside levels during lactation. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**:283-8.
224. **Puente, R., and P. Hueso.** 1993. Lactational changes in the N-glycolylneuraminic acid content of bovine milk gangliosides. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**:475-8.
225. **Ramachandran, V., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 2001. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J Clin Microbiol* **39**:1932-7.
226. **Reymond, D., M. A. Karmali, I. Clarke, M. Winkler, and M. Petric.** 1997. Comparison of the western blot assay with the neutralizing-antibody and enzyme-linked immunosorbent assays for measuring antibody to verocytotoxin 1. *J Clin Microbiol* **35**:609-13.
227. **Richter, H., H. Klie, M. Timm, P. Gallien, H. Steinrück, K. W. Perlberg, and D. Protz.** 1997. [Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in feces from cattle slaughtered in Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **110**:121-7.
228. **Ridpath, J. E., J. D. Neill, J. Endsley, and J. A. Roth.** 2003. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am J Vet Res* **64**:65-9.
229. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**:681-5.
230. **Robinson, S. E., E. J. Wright, C. A. Hart, M. Bennett, and N. P. French.** 2004. Intermittent and persistent shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves. *J Appl Microbiol* **97**:1045-53.
231. **Saif, L. J., and K. L. Smith.** 1985. Enteric viral infections of calves and passive immunity. *J Dairy Sci* **68**:206-28.
232. **Saif, L. J., P. Weilnau, K. Miller, and L. Stitzlein.** 1987. Isotypes of intestinal and systemic antibodies in colostrum-fed and colostrum-deprived calves challenged with rotavirus. *Adv Exp Med Biol* **216B**:1815-23.
233. **Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg, and H. C. Krivan.** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect Immun* **58**:611-8.
234. **Sanderson, M. W., T. E. Besser, J. M. Gay, C. C. Gay, and D. D. Hancock.** 1999. Fecal *Escherichia coli* O157:H7 shedding patterns of orally inoculated calves. *Vet Microbiol* **69**:199-205.
235. **Sandhu, K. S., R. C. Clarke, K. McFadden, A. Brouwer, M. Louie, J. Wilson, H. Lior, and C. L. Gyles.** 1996. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiol Infect* **116**:1-7.

-
236. **Sandvig, K., and B. van Deurs.** 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* **76**:949-66.
237. **Sanz, M. E., M. R. Vinas, and A. E. Parma.** 1998. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *Eur J Epidemiol* **14**:399-403.
238. **Sargeant, J. M., J. R. Gillespie, R. D. Oberst, R. K. Phebus, D. R. Hyatt, L. K. Bohra, and J. C. Galland.** 2000. Results of a longitudinal study of the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on cow-calf farms. *Am J Vet Res* **61**:1375-9.
239. **Schäfer, S., G. Wesenauer, and K. Arbeiter.** 1998. [Immunoglobulin transfer in the viable, newborn calf]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **105**:153-7.
240. **Schägger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-79.
241. **Schmidt, H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* **152**:687-95.
242. **Schmidt, H., and H. Karch.** 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**:2364-7.
243. **Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann, and H. Karch.** 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* **61**:534-43.
244. **Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, and H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**:1205-8.
245. **Schmitt, C. K., M. L. McKee, and A. D. O'Brien.** 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* **59**:1065-73.
246. **Schönenbrücher, H.** 2006. Untersuchungen zur Typisierung des *eae*-Gens enterohämorrhagischer und enteropathogener *Escherichia coli*. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
247. **Schoonderwoerd, M., R. C. Clarke, A. A. van Dreumel, and S. A. Rawluk.** 1988. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111:NM. *Can J Vet Res* **52**:484-7.
248. **Schüller, S., G. Frankel, and A. D. Phillips.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* **6**:289-301.
249. **Scotland, S. M., R. J. Gross, and B. Rowe.** 1985. Laboratory tests for enterotoxin production, enteroinvasion and adhesion in diarrhoeagenic *E.coli*. The virulence of *Escherichia coli*, Reviews and Methods, 359-405.
250. **Scotland, S. M., H. R. Smith, and B. Rowe.** 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet* **2**:885-6.
251. **Segura-Alvarez, M., H. Richter, F. J. Conraths, and L. Geue.** 2003. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays and a PCR test for detection of shiga toxins for shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle herds. *J Clin Microbiol* **41**:5760-3.
252. **Shaw, D. J., C. Jenkins, M. C. Pearce, T. Cheasty, G. J. Gunn, G. Dougan, H. R. Smith, M. E. Woolhouse, and G. Frankel.** 2004. Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. *Appl Environ Microbiol* **70**:7456-65.
253. **Sheng, H., M. A. Davis, H. J. Knecht, and C. J. Hovde.** 2004. Rectal administration of *Escherichia coli* O157:H7: novel model for colonization of ruminants. *Appl Environ Microbiol* **70**:4588-95.

254. **Sheng, H., H. J. Knecht, I. T. Kudva, and C. J. Hovde.** 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol* **72**:5359-66.
255. **Shere, J. A., K. J. Bartlett, and C. W. Kaspar.** 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **64**:1390-9.
256. **Sherman, P., R. Soni, M. Petric, and M. Karmali.** 1987. Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **55**:1824-9.
257. **Sinclair, J. F., E. A. Dean-Nystrom, and A. D. O'Brien.** 2006. The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and beta1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes in vivo. *Infect Immun* **74**:1255-65.
258. **Stadler, T.** 2002. Übergang von maternaler zu endogener IgG-Dominanz beim neugeborenen Kalb. Inaugural-Dissertation. Universität, Zürich.
259. **Stamm, I., M. Mohr, P. S. Bridger, E. Schröpfer, M. König, W. C. Stoffregen, E. A. Dean-Nystrom, G. Baljer, and C. Menge.** 2008. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect Immun*.
260. **Stamm, I., M. Wuhrer, R. Geyer, G. Baljer, and C. Menge.** 2002. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Microb Pathog* **33**:251-64.
261. **Stengel, K.-H.** 1998. Immunglobulin G - Bestimmungen im Blutserum neugeborener Kälber in den ersten zehn Lebenstagen sowie im Kolostrum derer Mütter mittels eines neu entwickelten kompetitiven ELISA. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
262. **Stephan, R., and L. E. Hoelzle.** 2000. Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. *Lett Appl Microbiol* **31**:139-42.
263. **Stevens, M. P., O. Marches, J. Campbell, V. Huter, G. Frankel, A. D. Phillips, E. Oswald, and T. S. Wallis.** 2002. Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. *Infect Immun* **70**:945-52.
264. **Stevens, M. P., A. J. Roe, I. Vlisidou, P. M. van Diemen, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, D. L. Gally, and T. S. Wallis.** 2004. Mutation of toxB and a truncated version of the efa-1 gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun* **72**:5402-11.
265. **Stevens, M. P., P. M. van Diemen, F. Dziva, P. W. Jones, and T. S. Wallis.** 2002. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiology* **148**:3767-78.
266. **Stevens, M. P., P. M. van Diemen, G. Frankel, A. D. Phillips, and T. S. Wallis.** 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun* **70**:5158-66.
267. **Stevens, M. P. W. T. S.** 2005. Adhesins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*., p. Chapter 8.3.3.2, *EcoSal-Escherichia coli* and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington DC
268. **Stoffregen, W. C., J. F. Pohlenz, and E. A. Dean-Nystrom.** 2004. *Escherichia coli* O157:H7 in the gallbladders of experimentally infected calves. *J Vet Diagn Invest* **16**:79-83.

269. **Stott, G. H., D. B. Marx, B. E. Menefee, and G. T. Nightengale.** 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. *J Dairy Sci* **62**:1632-8.
270. **Stott, G. H., D. B. Marx, B. E. Menefee, and G. T. Nightengale.** 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves II. The rate of absorption. *J Dairy Sci* **62**:1766-73.
271. **Stott, G. H., and B. E. Menefee.** 1978. Selective absorption of immunoglobulin IgM in the newborn calf. *J Dairy Sci* **61**:461-6.
272. **Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**:1116-22.
273. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1985. Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*. *Infect Immun* **50**:695-700.
274. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**:135-40.
275. **Synge, B., and G. Paiba.** 2000. Verocytotoxin-producing *E coli* O157. *Vet Rec* **147**:27.
276. **Synge, B. A., M. E. Chase-Topping, G. F. Hopkins, I. J. McKendrick, F. Thomson-Carter, D. Gray, S. M. Rusbridge, F. I. Munro, G. Foster, and G. J. Gunn.** 2003. Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows. *Epidemiol Infect* **130**:301-12.
277. **Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama, and K. Tsukamoto.** 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* **93**:157-65.
278. **Taga, S., K. Carlier, Z. Mishal, C. Capoulade, M. Mangeney, Y. Lecluse, D. Coulaud, C. Tetaud, L. L. Pritchard, T. Tursz, and J. Wiels.** 1997. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cells. *Blood* **90**:2757-67.
279. **Tarr, C. L., T. M. Large, C. L. Moeller, D. W. Lacher, P. I. Tarr, D. W. Acheson, and T. S. Whittam.** 2002. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**:6853-9.
280. **Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya, T. Hayashi, and C. Sasakawa.** 2001. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**:6660-9.
281. **Tatsuno, I., H. Kimura, A. Okutani, K. Kanamaru, H. Abe, S. Nagai, K. Makino, H. Shinagawa, M. Yoshida, K. Sato, J. Nakamoto, T. Tobe, and C. Sasakawa.** 2000. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells. *Infect Immun* **68**:5943-52.
282. **Thomas, A., T. Cheasty, H. Chart, and B. Rowe.** 1994. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H- and O101:H-carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**:1074-6.
283. **Tizard, I. R.** 2004. Immunity in the fetus and newborn. In I. R. Tizard (ed.), *Veterinary Immunology, An Introduction*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania
284. **Tkalcic, S., C. A. Brown, B. G. Harmon, A. V. Jain, E. P. Mueller, A. Parks, K. L. Jacobsen, S. A. Martin, T. Zhao, and M. P. Doyle.** 2000. Effects of diet on rumen

- proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. J Food Prot **63**:1630-6.
285. **Tkalcic, S., T. Zhao, B. G. Harmon, M. P. Doyle, C. A. Brown, and P. Zhao.** 2003. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. J Food Prot **66**:1184-9.
286. **Toth, I., M. L. Cohen, H. S. Rumschlag, L. W. Riley, E. H. White, J. H. Carr, W. W. Bond, and I. K. Wachsmuth.** 1990. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. Infect Immun **58**:1223-31.
287. **Tristao, L. C., A. G. Gonzalez, C. A. Coutinho, A. M. Cerqueira, M. J. Gomes, K. Irino, B. E. Guth, and J. R. Andrade.** 2007. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. Vet Microbiol **119**:358-65.
288. **Tyler, S. D., W. M. Johnson, H. Lior, G. Wang, and K. R. Rozee.** 1991. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol **29**:1339-43.
289. **Urashima, T., T. Saito, K. Ohmisya, and K. Shimazaki.** 1991. Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrum, including the novel trisaccharide; GalNAc alpha 1-3Gal beta 1-4Glc. Biochim Biophys Acta **1073**:225-9.
290. **van Diemen, P. M., F. Dziva, A. Abu-Median, T. S. Wallis, H. van den Bosch, G. Dougan, N. Chanter, G. Frankel, and M. P. Stevens.** 2007. Subunit vaccines based on intimin and Efa-1 polypeptides induce humoral immunity in cattle but do not protect against intestinal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 or O26:H. Vet Immunol Immunopathol **116**:47-58.
291. **Van Donkersgoed, J., T. Graham, and V. Gannon.** 1999. The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing. Can Vet J **40**:332-8.
292. **Van Donkersgoed, J., D. Hancock, D. Rogan, and A. A. Potter.** 2005. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. Can Vet J **46**:724-8.
293. **Vlisidou, I., F. Dziva, R. M. La Razione, A. Best, J. Garmendia, P. Hawes, P. Monaghan, S. A. Cawthraw, G. Frankel, M. J. Woodward, and M. P. Stevens.** 2006. Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun **74**:758-64.
294. **Vu-Khac, H., and N. A. Cornick.** 2007. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. Vet Microbiol.
295. **Wani, S. A., M. A. Bhat, I. Samanta, Y. Nishikawa, and A. S. Buchh.** 2003. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India. Lett Appl Microbiol **37**:121-6.
296. **Wani, S. A., I. Hussain, A. Nabi, I. Fayaz, and Y. Nishikawa.** 2007. Variants of eae and stx genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. Lett Appl Microbiol.
297. **Watarai, S., Tana, K. Inoue, Y. Kushi, E. Isogai, K. Yokota, K. Naka, K. Oguma, and H. Kodama.** 2001. Inhibition of Vero cell cytotoxic activity in *Escherichia coli*

- O157:H7 lysates by globotriaosylceramide, Gb3, from bovine milk. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**:414-9.
298. **Weber, A., H. Klie, H. Richter, P. Gallien, M. Timm, and K. W. Perlberg.** 1997. [Present problems in detection of sources of infection and chains of infection with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **110**:211-3.
 299. **Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* **170**:4223-30.
 300. **Wells, J. G., L. D. Shipman, K. D. Greene, E. G. Sowers, J. H. Green, D. N. Cameron, F. P. Downes, M. L. Martin, P. M. Griffin, S. M. Ostroff, and et al.** 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* **29**:985-9.
 301. **Widiasih, D. A., N. Ido, K. Omoe, S. Sugii, and K. Shinagawa.** 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* **132**:67-75.
 302. **Widiasih, D. A., I. Matsuda, K. Omoe, D. L. Hu, S. Sugii, and K. Shinagawa.** 2004. Passive transfer of antibodies to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 antigens in neonatal calves by feeding colostrum. *J Vet Med Sci* **66**:213-5.
 303. **Wieler, L. H.** 1996. Bestimmung von Virulenzfaktoren boviner Shiga-Toxin-bildender *Escherichia coli*-(STEC)-Stämme als Bewertungsgrundlage ihrer klinischen Bedeutung für Rind und Mensch. Habilitationsschrift. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
 304. **Wieler, L. H., and R. Bauerfeind.** 2003. STEC as a veterinary problem. *Diagnostics and prophylaxis in animals. Methods Mol Med* **73**:75-89.
 305. **Wieler, L. H., R. Bauerfeind, and G. Baljer.** 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl Bakteriol* **276**:243-53.
 306. **Wieler, L. H., A. Schwanitz, E. Vieler, B. Busse, H. Steinrück, J. B. Kaper, and G. Baljer.** 1998. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J Clin Microbiol* **36**:1604-7.
 307. **Wieler, L. H., G. Sobjinski, T. Schlapp, K. Failing, R. Weiss, C. Menge, and G. Baljer.** 2007. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **120**:296-306.
 308. **Wieler, L. H., E. Vieler, C. Erpenstein, T. Schlapp, H. Steinrück, R. Bauerfeind, A. Byomi, and G. Baljer.** 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J Clin Microbiol* **34**:2980-4.
 309. **Wilson, J. B., S. A. McEwen, R. C. Clarke, K. E. Leslie, R. A. Wilson, D. Waltner-Toews, and C. L. Gyles.** 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect* **108**:423-39.
 310. **Wilson, M. R., J. R. Duncan, F. Heistand, and P. Brown.** 1972. The influence of preparturient intramammary vaccination on immunoglobulin levels in bovine mammary secretions. *Immunology* **23**:313-20.
 311. **Woodward, M. J., D. Gavier-Widen, I. M. McLaren, C. Wray, M. Sozmen, and G. R. Pearson.** 1999. Infection of gnotobiotic calves with *Escherichia coli* o157:h7 strain A84. *Vet Rec* **144**:466-70.

312. **Wray, C., I. McLaren, and G. R. Pearson.** 1989. Occurrence of 'attaching and effacing' lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verocytotoxic *E coli*. *Vet Rec* **125**:365-8.
313. **Wray, C., I. M. McLaren, L. P. Randall, and G. R. Pearson.** 2000. Natural and experimental infection of normal cattle with *Escherichia coli* O157. *Vet Rec* **147**:65-8.
314. **Wuhrer, M., C. Berkefeld, R. D. Dennis, M. A. Idris, and R. Geyer.** 2001. The liver flukes *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* express the leucocyte cluster of differentiation marker CD77 (globotriaosylceramide) in their tegument. *Biol Chem* **382**:195-207.
315. **Yokomizo, Y., F. Watanabe, Y. Imada, S. Inumaru, T. Yanaka, and T. Tsuji.** 2002. Mucosal immunoadjuvant activity of the low toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by *Bacillus brevis* for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Vet Immunol Immunopathol* **87**:291-300.
316. **Zaremba, W., E. Grunert, W. Heuwieser, and H. Schiffner-Mehrens.** 1985. [Immunoglobulin absorption in calves following administration of colostrum by probang in comparison to spontaneous intake]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **92**:18-20.
317. **Zaremba, W., E. Grunert, and P. Kellner.** 1986. [Immunoglobulin absorption in calves following the administration of cattle blood through a stomach tube]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **93**:472-5.
318. **Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **40**:1441-6.
319. **Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. Mueller, and A. H. Parks.** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol* **36**:641-7.
320. **Zhao, T., M. P. Doyle, J. Shere, and L. Garber.** 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* **61**:1290-3.
321. **Zhao, T., S. Tkalcic, M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, and P. Zhao.** 2003. Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* **66**:924-30.
322. **Zschöck, M., H. P. Hamann, B. Kloppert, and W. Wolter.** 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol* **31**:203-8.
323. **Zweifel, C., S. Schumacher, M. Blanco, J. E. Blanco, T. Tasara, J. Blanco, and R. Stephan.** 2005. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. *Vet Microbiol* **105**:37-45.

XI Anhang

1 Übersicht untersuchte Tiere

Tab. 27: Übersicht Muttertiere

Muttertier Nr.	Ohrmarke	Rasse	Geboren
1	DE 06615-70574	1	k.A.
2	DE 06621-92464	1	21.06.2003
3	DE 06621-92462	1	09.05.2003
4	DE 06621-92454	1	01.03.2003
5	DE 06627-42727	8	12.06.2003
6	DE 06618-47129	1	05.11.2002
7	DE 06618-47106	1	22.12.2001
8	DE 06618-05413	1	k.A.
9	DE 06612-92369	1	02.02.2000
10	DE 06621-92470	1	21.07.2003
11	DE 06612-92355	2	02.09.1999
12	DE 06613-40211	9	13.10.1999
13	DE 06616-94119	1	29.08.2001
14	DE 06621-92479	2	19.11.2003
15	DE 06616-94134	6	18.07.2001
16	DE 06616-94141	2	25.02.2003
17	DE 06623-97701	1	27.02.2004
18	DE 06622-73398	1	01.07.2004
19	DE 06621-92477	1	30.10.2003
20	DE 06616-94117	1	20.06.2001
21	DE 06614-95844	1	06.11.2000
22	DE 06616-94118	1	31.07.2001
23	DE 06614-85430	4	02.04.2001
24	DE 06619-99623	2	02.02.2003
25	DE 06614-95853	1	30.01.2001
26	DE 06621-92478	7	04.11.2003

Muttertier Nr.	Ohrmarke	Rasse	Geboren
27	DE 06618-47127	1	18.10.2002
28	DE 06631-09197	1	13.01.1996
29	DE 06616-94123	1	20.09.2001
30	DE 06619-99626	5	19.07.2003
31	DE 06619-99625	3	24.04.2003
32	DE 06616-74839	1	14.06.2001
33	DE 06614-95837	7	05.10.2000

Erläuterungen: Rasse: Deutsche Holsteins schwarzbunt (1); Deutsche Holsteins rotbunt (2); Braunvieh (3); Fleckvieh (4); Vogelsberger Höhenvieh (5); Jersey (6); Deutsch Schwarzbuntes Rind (7); Pinzgauer (8); Fleckvieh x Deutsche Holsteins schwarzbunt (9); **k.A.:** keine Angaben.

Tab. 28: Übersicht Kälber

Kalb Nr.	Ohrmarke	Rasse	Geschlecht	Geboren
1	DE 06625-33773	1	m	03.10.2005
2	DE 06627-60304	1	m	20.12.2005
3	DE 06625-33776	1	w	14.10.2005
4	DE 06625-33770	1	m	28.09.2005
5	DE 06625-42727	8	w	01.12.2005
6	DE 06627-60315	2	w	10.04.2006
7	DE 06625-33769	1	w	20.08.2005
8	DE 06627-60301	1	m	13.11.2005
9	DE 06627-60310	1	w	20.02.2006
10	DE 06625-33777	1	m	01.11.2005
11	DE 06625-33768	2	w	16.08.2005
12	DE 06625-33771	9	w	28.09.2005
13	DE 06627-60312	1	w	10.03.2006
14	DE 06627-60317	2	w	14.04.2006
15	DE 06625-42722	6	w	08.09.2005
16	DE 06625-33779	2	w	05.11.2005
17a	DE 06627-60323	1	w	23.06.2006
17b	DE 06627-60324	1	w	23.06.2006
18	DE 06627-60321	1	w	30.05.2006

Kalb Nr.	Ohrmarke	Rasse	Geschlecht	Geboren
19	DE 06627-60307	1	w	27.01.2006
20	DE 06627-60314	1	m	01.04.2006
21	DE 06627-60305	2	w	25.12.2005
22	DE 06627-60304	1	w	22.12.2005
23	DE 06625-42726	4	w	11.11.2005
24	DE 06625-33780	2	w	06.11.2005
25	DE 06627-60313	1	w	14.03.2006
26	DE 06627-60316	7	w	11.04.2006
27	DE 06627-60309	1	w	20.02.2006
28	DE 06627-60306	1	w	05.01.2006
29	DE 06627-60318	1	w	16.04.2006
30	DE 06625-42728	5	w	18.04.2006
31a	DE 06625-42724	3	m	30.09.2005
31b	DE 06625-42725	3	m	30.09.2005
32	DE 06627-60319	1	w	19.04.2006
33	DE 06625-33778	7	w	04.11.2005

Erläuterungen: Rasse: Deutsche Holsteins schwarzbunt (1); Deutsche Holsteins rotbunt (2); Braunvieh (3); Fleckvieh (4); Vogelsberger Höhenvieh (5); Jersey (6); Deutsch Schwarzbuntes Rind (7); Pinzgauer (8); Fleckvieh x Deutsche Holsteins schwarzbunt (9); **m:** männlich; **w:** weiblich.

Tab. 29: weitere untersuchte Tiere

Tier Nr.	Ohrmarke	Geschlecht	Geboren
1	DE 06625-33746	w	24.12.2004
2 ²⁾	DE 06625-33769	w	20.08.2005
3	DE 06625-33759	w	20.03.2005
4	DE 06625-33765	w	16.06.2005
5	DE 06625-33767	w	10.08.2005
6	DE 06625-33747	w	24.01.2005
7 ¹⁾	DE 06627-60309	w	20.02.2006
8 ¹⁾	DE 06627-60307	w	27.01.2006
9 ¹⁾	DE 06625-33779	w	05.11.2005
10 ¹⁾	DE 06625-33780	w	07.11.2005

Tier Nr.	Ohrmarke	Geschlecht	Geboren
11 ¹⁾	DE 06625-33776	w	14.10.2005
12 ¹⁾	DE 06625-33772	w	28.09.2005
13 ¹⁾	DE 06627-60306	w	05.01.2006
14 ¹⁾	DE 06627-60312	w	10.03.2006
15	DE 06623-97727	w	09.10.2004
16	DE 06625-33745	w	20.11.2004
17	DE 06623-97717	w	23.07.2004
18	DE 06623-97705	w	25.05.2004
19	DE 06623-97713	w	07.07.2004
20	DE 06619-99636	w	26.06.2004
21	DE 06623-97725	w	02.10.2004
22	DE 06623-97770	w	27.02.2004
23	DE 06623-97729	w	12.10.2004
24 ¹⁾	DE 06627-60317	w	14.04.2006
25 ¹⁾	DE 06627-60324	w	23.06.2006
26 ¹⁾	DE 06627-60315	w	10.04.2006
27 ¹⁾	DE 06627-60319	w	19.04.2006
28 ¹⁾	DE 06627-60323	w	23.06.2006
29 ¹⁾	DE 06625-33768	w	16.08.2005
30 ²⁾	DE 06625-33769	w	20.08.2005
31 ²⁾	DE 06625-33772	w	28.09.2005
32	DE 06625-42722	w	08.09.2005
33 ²⁾	DE 06625-33776	w	14.10.2005

Erläuterungen: 1): Tiere wurden bereits im Rahmen der Studie regelmäßig im Kälberalter beprobt, eine weitere Probenahme erfolgte nach Ablauf der Untersuchungszeit; **2):** Tiere wurden bereits im Rahmen der Studie regelmäßig im Kälberalter beprobt, zwei weitere Probenahmen erfolgten nach Ablauf der Untersuchungszeit; **w:** weiblich.

2 Stx-spezifische Antikörper, Verozell-Neutralisationstest und kompetitiver ELISA, einzelne Titerwerte

Tab. 30: Einzelwerte StxAk-Titer (Verozell-Neutralisationstest), Proben der Muttertiere

Muttertier Nr.	Ohrmarke	Stx1Ak-Titer			Stx2-Ak-Titer		
		Serum	Kolostrum	Milch	Serum	Kolostrum	Milch
1	DE 06615-70574	68	121	15	15	15	15
2	DE 06621-92464	133	142	15	15	15	15
3	DE 06621-92462	248	376	30	15	15	15
4	DE 06621-92454	103	426	15	15	15	15
5	DE 06627-42727	90	598	n.u.	15	30	n.u.
6	DE 06618-47129	87	725	15	15	15	15
7	DE 06618-47106	75	769	15	15	15	15
8	DE 06618-05413	100	789	15	15	15	15
9	DE 06612-92369	484	791	15	15	15	15
10	DE 06621-92470	129	826	n.u.	15	15	n.u.
11	DE 06612-92355	442	957	15	30	30	15
12	DE 06613-40211	137	1002	15	15	15	n.u.
13	DE 06616-94119	64	1040	15	15	15	15
14	DE 06621-92479	268	1358	15	15	30	15
15	DE 06616-94134	293	1374	15	30	30	15
16	DE 06616-94141	1031	1554	15	15	15	15
17	DE 06623-97701	556	1562	15	15	30	15
18	DE 06622-73398	n.u.	1785	15	n.u.	15	15
19	DE 06621-92477	127	1848	15	15	30	15
20	DE 06616-94117	n.u.	1971	n.u.	n.u.	15	n.u.
21	DE 06614-95844	914	2238	15	15	15	15
22	DE 06616-94118	289	2360	15	15	15	15
23	DE 06614-85430	810	2423	15	15	15	15
24	DE 06619-99623	2986	2499	30	15	15	15
25	DE 06614-95853	104	2880	15	15	15	15
26	DE 06621-92478	492	3077	15	15	15	15
27	DE 06618-47127	736	3128	15	15	15	15
28	DE 06631-09197	481	3462	15	15	15	15
29	DE 06616-94123	391	3831	15	15	15	15
30	DE 06619-99626	873	4173	15	15	30	15
31	DE 06619-99625	2008	4922	30	15	15	15
32	DE 06616-74839	368	8658	15	30	30	15
33	DE 06614-95837	1362	12046	30	15	15	15

Erläuterungen: Kolostrum des Tier Nr. 15 wies auch einen Neutralisationstiter von 30 gegen Stx2c auf; **n.u.:** nicht untersucht.

Tab. 31: Einzelwerte Stx1Ak-Titer (Verozell-Neutralisationstest) im Serum von Kälbern

Kalb.Nr.	Ordnung	Geburt	24h.p.n.	1LW	2LW	3LW	4LW	5LW	6LW	7LW	8LW	9LW	10LW	11LW	12LW	13LW	14LW	15LW	16LW	17LW	18LW	19LW	20LW	21LW	22LW	23LW	24LW
1	DE 06825-3373	15	15	74	70	15																					
2	DE 06827-6004	15	15	15	15	15	15																				
3	DE 06825-3376	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15		15	15		15		15		15	15	
4	DE 06825-3370	15	260	166	140	148																					
5	DE 06825-4277	15	101	102		80		67		67																	
6	DE 06827-60315	15	105	72	75	71	67	67	63	67	15	15	15	15	15	15	15		15		15		15		15	15	
7	DE 06825-33769	15	177	128	135	87	80	132	109	86	76	101	81	59	15	15		72			15		15		15	15	
8	DE 06827-60301	96	104	108	92	70	98	98	79	76	15	15	15	15	15	15											
9	DE 06827-60310	15	119	108	154	138	118	77	89	15	15	15	15	15	15	15	15		15		15		15		15	190	
10	DE 06825-33777	165	791	383	264	270	167	120																			
11	DE 06825-33768	15	329	433	251	183	149	158	116	135	335	464	254	322	303	513		388			226		117		85	108	
12	DE 06825-33771	15	118	118	110	119	106	112	103	15	15	15	15	15	15	15	15		79		1748		2004		650		
13	DE 06827-60312	105	126	76	77	78	78	79	15	15	15	15	15	15	15	15	15		15		15		15		15	15	
14	DE 06827-60317			15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15		15		15		15		15	15	
15	DE 06825-42722	644	891	543	476	500	321	207	161	147	145	125	105	90	91		72		15		30		128		188	146	
16	DE 06825-33779	15	1643	1408	1850	1445	1164	793	471	592	454	387	317				62		125					179		86	
17a	DE 06827-60323	15	306	492	276	133	152	151	154	97	78	66	70	80	73						15		15			15	
17b	DE 06827-60324	123	388	346	176	132	131	117	112	91	83	71	76	63	15		15				15		15		15	15	
18	DE 06827-60321	15	796	225	186	233	153	96	90	93	71	30	15	30	15		15		15		15		15		15	98	
19	DE 06827-60307	15	441	306	234	203	127	116	97	82	72	71	80	15	15		15		15		15		15		316	213	
20	DE 06827-60314	15	184	128	111	120	117	78	79	80	78	15															
21	DE 06827-60305		853	549	560	372	486	240	236	205	141	144	125	131	72		64		15		15		15		15	62	
22	DE 06827-60304	15	652	460	467	286	190	200	131	139	111	131	123	110	113		76		67		15		15		15	224	
23	DE 06825-42726	15	1031	592		362	305	488	362	175	200	115	118	121	113		82		70		15		15		15	15	
24	DE 06825-33780	15	2163	1610	1312	953	880	559	524	618	436	347	203	201		192		122		118		120		15		15	
25	DE 06827-60313	336	289	297	341	158	164	143	115	108	79	79	15	15	15		15		15		15		15		15	15	
26	DE 06827-60316	15	310	363	419																						
27	DE 06827-60309	108	211	197	140	131	109	94	86	76	83	15	15	15	15		15		15		15		15		15	15	
28	DE 06827-60306	15	493	436	184	154	144	145	138	127	106	85	79	15	15	15		15		15		15		728		375	
29	DE 06827-60318		590	631	279	245	294	330	246	176	135	100	118	86	62		51		15		15		15		15	15	
30	DE 06825-42728	15	849	217	275	369	310	273	196	140	113	116	71	74	68		15		15		15		30		82	137	
31a	DE 06825-42724	15	552	662	566	372																					453
31b	DE 06825-42725	1354	2754	1801	1683	1472																					
32	DE 06827-60319	467	1930	1159	379	285	234	221	258	190	136	117	125	107	93		74		15		15		15		15	15	
33	DE 06825-33778	15	1448	2240	1547	1486	1350	592	591	614	436	409	342	219	207	141		98		65		154		68		67	

Tab. 33: Einzelwerte StxAk-Titer (Verozell-Neutralisationstest), Proben weiterer Tiere

weitere Tiere Nr.	Ohrmarke	Geb.datum	Datum Probenentnahme	Alter [Jahre] bei Probenentnahme	Titer Stx1Ak	Titer Stx2Ak
1	DE 06625-33746	24.12.2004	31.01.2007	2	325	15
2	DE 06625-33769	20.08.2005	31.01.2007	2	130	15
3	DE 06625-33759	20.03.2005	31.01.2007	2	95	15
4	DE 06625-33765	16.06.2005	31.01.2007	2	108	15
5	DE 06625-33767	10.08.2005	31.01.2007	2	1085	15
6	DE 06625-33747	24.01.2005	31.01.2007	2	99	15
7	DE 06627-60309	20.02.2006	31.01.2007	1	15	15
8	DE 06627-60307	27.01.2006	31.01.2007	1	86	15
9	DE 06625-33779	05.11.2005	31.01.2007	1	15	15
10	DE 06625-33780	07.11.2005	31.01.2007	1	15	15
11	DE 06625-33776	14.10.2005	31.01.2007	1	15	15
12	DE 06625-33772	28.09.2005	31.01.2007	1	103	15
13	DE 06627-60306	05.01.2006	31.01.2007	1	15	15
14	DE 06627-60312	10.03.2006	31.01.2007	1	15	15
15	DE 06623-97727	09.10.2004	31.01.2007	2	84	15
16	DE 06625-33745	20.11.2004	31.01.2007	2	540	15
17	DE 06623-97717	23.07.2004	31.01.2007	3	15	15
18	DE 06623-97705	25.05.2004	31.01.2007	3	146	30
19	DE 06623-97713	07.07.2004	31.01.2007	3	90	15
20	DE 06619-99636	26.06.2004	31.01.2007	3	294	15
21	DE 06623-97725	02.10.2004	31.01.2007	2	15	15
22	DE 06623-97770	27.02.2004	31.01.2007	3	130	15
23	DE 06623-97729	12.10.2004	31.01.2007	2	15	15
24	DE 06627-60317	14.04.2006	31.01.2007	1	15	15
25	DE 06627-60324	23.06.2006	31.01.2007	1	15	15
26	DE 06627-60315	10.04.2006	31.01.2007	1	15	15
27	DE 06627-60319	19.04.2006	31.01.2007	1	15	15
28	DE 06627-60323	23.06.2006	31.01.2007	1	15	15
29	DE 06625-33768	16.08.2005	16.08.2006	1	1706	15
30	DE 06625-33769	20.08.2005	16.08.2006	1	15	15
31	DE 06625-33772	28.09.2005	16.08.2006	1	68	15
32	DE 06625-42722	08.09.2005	16.08.2006	1	73	15
33	DE 06625-33776	14.10.2005	16.08.2006	1	15	15

Tab. 34: Einzelwerte relIHOD (kompetitiver ELISA) überprüfter Kälberseren gegen Stx1

Kalb Nr.	Ohrmarke	Alter	Titer Stx1Ak	relIHOD [Stx1]
15	DE 06625-42722	p.n.	644	92,8
		24 h p.n.	891	93,4
		1 LW	543	91,7
		2 LW	476	89,4
		3 LW	500	87,6
		4 LW	321	85,2
		5 LW	207	79,0
		6 LW	161	70,5
		7 LW	147	56,7
		8 LW	145	51,9
		9 LW	125	40,9
		10 LW	105	21,5
		11 LW	90	18,6
		12 LW	91	35,5
		14 LW	72	20,4
		16 LW	15	21,0
		18 LW	15	11,3
		20 LW	128	61,2
33	DE 06625-33778	p.n.	15	12,0
		24 h p.n.	1448	91,7
		1 LW	2240	94,0
		2 LW	1547	93,8
		5 LW	582	89,7
		8 LW	436	85,1
		10 LW	342	76,2
		11 LW	219	70,1
		13 LW	141	57,8
		15 LW	98	42,7
		17 LW	65	29,4

Erläuterungen: **p.n.:** Serumprobe unmittelbar nach der Geburt; **24 h p.n.:** Serumprobe innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt; **LW:** Lebenswoche; **relIHOD[Stx1]:** relative inhibitorische optische Dichte bei Verwendung von Stx1-haltigem Lysat; **TiterStx1Ak:** Titer Stx1-spezifischer neutralisierender Antikörper im Verozell-Neutralisationstest.

Tab. 35: Einzelwerte relIHOD (kompetitiver ELISA) überprüfter Kälberseren gegen Stx2

Kalb Nr.	Ohrmarke	Alter	Titer Stx2Ak	rel. Zellaktivität [%]	relIHOD [Stx2]
3	DE 06625-33776	20 LW	15		-1,2
7	DE 06625-33769	11 LW	15		4,9
		13 LW	15		5,5
		19 LW	15		7,0
		24 LW	15		8,9
8	DE 06627-60301	10 LW	15		-2,6
		12 LW	15		-3,1
11	DE 06625-33768	p.n.	15		-8,6
		24 h p.n.	30	70,0	-1,1
		1 LW	30	58,0	-5,1
		2 LW	30	31,0	-2,8
		3 LW	30	61,0	-1,8
		4 LW	30	44,0	-1,7
		5 LW	30	43,0	-6,8
		6 LW	30	58,0	-3,3
		7 LW	30	43,0	-3,3
		8 LW	15		-4,6
		9 LW	15		-4,8
		12 LW	15		-3,9
		15 LW	15		-2,4
		19 LW	15		-1,1
		24 LW	15		-3,6
12	DE 06625-33771	8 LW	15		-3,5
		12 LW	15		-4,3
		16 LW	15		-5,9
		20 LW	15		-1,5
15	DE 06625-42722	p.n.	30	54,6	22,9
		24 h p.n.	30	59,5	27,9
		1 LW	30	65,6	20,5
		2 LW	30	52,5	19,1
		3 LW	30	41,3	15,1
		4 LW	30	35,2	15,3
		5 LW	30	31,6	7,8
		6 LW	30	35,2	5,0
	DE 06616-94134	MT Bella	30	42,0	15,9
33	DE 06625-33778	15 LW	15		1,0
		19 LW	15		2,7

Erläuterungen: **p.n.:** Serumprobe unmittelbar nach der Geburt; **24 h p.n.:** Serumprobe innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt; **LW:** Lebenswoche; **relIHOD[Stx2]:** relative inhibitorische optische Dichte bei Verwendung von Stx2-haltigem Lysat; **rel.Zellaktivität [%]:** im Verozell-Neutralisationstest ermittelte relative optische Dichte (OD_{rel}) des Serums in der entsprechenden Verdünnungsstufe gemessen an Positiv- und Negativkontrolle; **TiterStx2Ak:** Titer Stx2-spezifischer neutralisierender Antikörper im Verozell-Neutralisationstest.

Tab. 36: Einzelwerte relIHOD (kompetitiver ELISA) überprüfter Kälberseren gegen Stx2c

Kalb Nr.	Ohrmarke	Alter	relIHOD [Stx2c]
3	DE 06625-33776	20 LW	-2,2
7	DE 06625-33769	11 LW	2,7
		13 LW	2,2
		19 LW	0,8
		24 LW	2,0
8	DE 06627-60301	10 LW	1,6
		12 LW	0,8
11	DE 06625-33768	p.n.	-1,7
		24 h p.n.	-3,4
		1 LW	-2,0
		2 LW	-2,0
		3 LW	-1,1
		4 LW	-0,8
		5 LW	2,2
		6 LW	-4,4
		7 LW	-1,5
		8 LW	-0,7
		9 LW	-1,6
		12 LW	-2,1
		15 LW	-1,4
		19 LW	-1,1
		24 LW	-0,3
12	DE 06625-33771	8 LW	0,5
		12 LW	-1,8
		16 LW	-0,8
		20 LW	-0,8
15	DE 06625-42722	p.n.	1,8
		24 h p.n.	3,3
		1 LW	3,0
		2 LW	6,2
		3 LW	0,0
		4 LW	0,7
		5 LW	-0,1
		6 LW	0,7
		8 LW	-4,9
		12 LW	0,7
		16 LW	0,0
		20 LW	2,0
33	DE 06616-94134	MT Bella	-0,1
	DE 06625-33778	15 LW	1,1
		19 LW	0,3

Erläuterungen: p.n.: Serumprobe unmittelbar nach der Geburt; 24 h p.n.: Serumprobe innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt; LW: Lebenswoche; relIHOD[Stx2c]: relative inhibitorische optische Dichte bei Verwendung von Stx2c-haltigem Lysat.

3 Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 37: Verwendete Geräte

Gerät/Modell	Firma
Autoklav FVS/2	Fa. FEDEGARI, ORT, Italien
Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K	Fa. Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
BIO-RAD CHEF Mapper und Variable Speed Pump	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Brutschrank B 50 60 EK-CO ₂	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank Typ BB 6220	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Eismaschine UBE-50-35	Fa. Ziegra, Isernhagen
elektrische Pumpe, easy-load Masterflex®	Fa. Millipore GmbH, Eschborn
Elektrophoresekammer für Agarosegele (100 ml) (Electro 4)	Fa. HYBAID GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammer für Proteingele Minigel-Twin Typ G42	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Feinwaage AE 163	Fa. Mettler-Waagen, Gießen
Feinwaage EW600-2M	Fa. Kern, Albstadt
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RB	Fa. Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Gelgießstand und Kamm für PFGE	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Geltrockner Gel Dryer 543	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Inversmikroskop Labovet FS	Fa. Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Inversmikroskop Leitz DM IL	Fa. Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
Kühlung Colora	Fa. Messtechnik Lorch
Magnetrührer IKA COMBIMAG RED	Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipette Research Mehrkanal 2-200 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette Research Mehrkanal 30-300 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Microprocessor pH-Meter pH537	Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikrowellengerät	Fa. Durabrand
Multistepper 50/100/150/200 µl	Fa. Titertek®, für Labsystems GmbH, Meckenheim
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1000 mm, 0,0025 mm ²)	Fa. Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Photometer DU® 640	Fa. Beckman Instruments, München
Pipetten, Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl,	Fa. Eppendorf AG, Hamburg

Gerät/Modell	Firma
100-1000 µl	
Plattenphotometer Titertek Multiscan Ascent	Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim
Probenkamm für Proteingele, 2-zählig	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Schüttelwasserbad GFL 1083	Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Semidry-Blotkammer	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sicherheitswerkbank Microflow S1424/1	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Sorvall Zentrifuge RC 5B Plus	Fa. Sorval-Dupont, Bad Homburg
Spannungsgerät 250/2.5 Power Supply	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Sterilbank Laminar HB 2472	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Stromgeber 3000 Xi Electrophoresis Power Supply	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Thermocycler 1, GeneAmp PCR Systems 9600	Fa. PERKIN ELMER, Norwalk, U.S.A.
Thermocycler 5, TGradient 96	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Fa. Hettich, über MAGV, Rabenau-Londorf
Überkopfschüttler für Reaktionsgefäße REAX 104	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Ultraschallgerät Branson & Schallkopf, ½-Titan-Resonator Sonifer B15	Fa. G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Ultrazentrifuge L8-55 (Rotor Ti75)	Fa. Beckmann, München
UV-Kammer Stratalinker 1800	Fa. Stratagene, La Jolla, U.S.A.
Vortex Type RFAX 1R	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Wasserbad	Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wippe	Eigenbau der Institutswerkstatt
Zentrifuge / Sepatech Omnifuge 2.0 RS	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge 5804R	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Sigma 4K15	Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

Tab. 38: Verwendete Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	M2128
4-Chloro-1-Naphthol	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	C-8890
6-Aminocaprinsäure	Fa. Serva Electrophoresis GmbH,	12548

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
	Heidelberg	
Acrylamid / Bisacrylamid (46,5/3)	Fa. AppliChem GmbH KGaA Darmstadt	A2802
Acrylamid / Bisacrylamid (48/1,5)	Fa. AppliChem GmbH KGaA Darmstadt	A2805
Amidoschwarz	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1167
APS (Ammoniumpersulfat)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	A-1433
Blocking Reagent for ELISA	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	11112589001
Blut-Agar (Basis)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.10886
Bovine IgA Antibody, HRP-markiert, sheep	Bethyl Laboratories, INC. über AXXORA DEUTSCHLAND GmbH, Lörrach	A10-121P
Bovine IgG ₁ Antibody, HRP-markiert, sheep	Fa. Bethyl Laboratories, INC. über AXXORA DEUTSCHLAND GmbH, Lörrach	A10-116P
Bovine IgG ₂ Antibody, HRP-markiert, sheep	Fa. Bethyl Laboratories, INC. über AXXORA DEUTSCHLAND GmbH, Lörrach	A10-117P
BPE → Rinderhypophysenextrakt		
Bromphenolblau (Na-Salz)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8122
Buffer Y ⁺ /Tango™	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	#BY5
Cefexime-Tellurit Supplement	Fa. Oxoid GmbH, Wesel	SR0172
Collagen R-Lösung (2 mg/ml)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	47254
Collagenase 1 (Typ CLS mit 242 U/mg)	Fa. Biochrom AG, Berlin	C-I22
D-(+)-Glucose (wasserfrei)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8337
D-(+)-Glucose-Lösung (45 %)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	G8769
D(+)-Mannose	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	5984
Deoxycholinsäure Na-salz	Fa. Fluka Chemie, Buchs, CH	30970
Digitonin (wasserlöslich)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	D1407
DMEM mit L-Valin	Fa. GIBCO™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe	21885-025

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
D-Sorbitol	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	S-3889
EDTA-Disodium	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11280
Eisessig (Rotipuran ® Essigsäure 100 %)	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3738.2
Epidermal growth factor (EGF)	Fa. A F Schützdecker GmbH, Reutlingen	
Ethanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.00983
Ethanol 99 %	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.00983.1011
Ethidiumbromid	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
Ethidiumbromid 1%-ige Lösung	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
FITC (Fluoreszein-Iso-Thiozyanat)-Phalloidin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P04-18500
Fötales Kälberserum (FKS)	Fa. Biowest LLC, Miami, U.S.A.	S1810
Fötales Kälberserum (FKS), dialysiert	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	A15-245
Gassner-Närboden (Basis)	Fa. Oxoid GmbH, Wesel	GFG01B
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0241
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0242
Gentamicin	Fa. Biochrom AG, Berlin	A2710
Giemsa-Stammlösung	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	9204
Glycerin	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8.18709.1000
Hefe-Extrakt	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.03753
Hydrocortison	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	H-0888
InCert Agarose	Fa. Cambrex Bio Science Rockland, Inc. über Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf	50123 (850123 Biozym)
Insulin, bovines	Fa. Biochrom AG, Berlin	K 3510
Isopropanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.09634.2511
Lambda Ladder PFG Marker	Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	N0340S
L-Glutamin	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	M11-004

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Long EGF	Fa. A F Schützdeller GmbH	
Lysozym	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	L-6876
Methanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	CH3085
MgCl ₂ (50mM)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Mowiol 4-88	Fa. Clariant	-
NaCl	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3957.2
NH ₄ -Mix (10 x PCR-Puffer)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Fa. Biochrom AG, Berlin	K 0293
N-Lauroylsarcosine Na-Salz	Fa. Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, CH	61743
Novitec® Verotoxin ELISA-Test (Verotoxine 1 & 2)	Fa. HISS Diagnostics GmbH, Freiburg	710096
Nukleotide, dNTP	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	PAN 739026
Ovines Serum	Institutseigene Gewinnung	-
PANScript Polymerase (5 U/μl)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	104005
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	P11-010
PMSF	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P 7626-5G
Polymyxin B »Pfizer«	Pfizer GmbH, Karlsruhe	-
pPD (p-Phenylendiamin)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P-6001
Proteinase K	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	03 115 828 001
Pulsed Field Certified Agarose	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München	162-0137
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	c.c. pro GmbH, Neustadt	G-11-T
RNase A	-	-
RPMI 1640 Medium (mit 2mM stab. L- Glutamin und 2.0 g/l NaHCO ₃)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	P04-18500
Salzsäure	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1.00319.2500
Schafblut (defibriniert)	Institutseigene Gewinnung	-

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	2326.2
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard-Marker	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe	LC5925
Serva Blue G	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	35050
Shigatoxin 1 (Verotoxin 1)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	V2388
Shigatoxin 2 (Verotoxin 2)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	V2513
Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar	Fa. Oxoid GmbH, Wesel	CM0813
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	35925
Thioharnstoff	Fa. Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, CH	88810
Tricine [N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin]	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37195
Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4855.2
Trypanblau	Dr. G. Grübler & Co., Leipzig	-
Trypsin (10x)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	L-11-001
Trypton	Fa. Difco, Augsburg	123-17-3
Tween 20 ®	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8.22184.0500
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	822287
XbaI, 1500 U	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	#ER0681
Xylene Cyanole FF	Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg	38505
β-Mercaptoethanol	Fa. Fluka über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	63689

Tab. 39: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
10 ml-Röhre mit Serumgerinnungsaktivator	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	46361
12-Well Platte (3,8 cm ²)	Fa. Costar, Corning Incorporated, über Fisher Scientific GmbH, Nidderau	CLS3513

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
12-Well Platte (3,8 cm ²)	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	1500628
30 ml Analysegefäß für Ultraschall-Lysate	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	668102
30 ml Spritze	Fa. Becton Dickinson Braunschweig GmbH, Braunschweig	-
50 ml Plastikröhre	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227261
Deckgläschen 18x18mm	Fa. Menzel-Gläser, über MAGV GmbH, Rabenau	
Einmalkanülen 18 x 1,5 Unlock	Fa. HMD Healthcare Limited, Horsham, U.K.	-
Einmalkanülen Neobject®, 17G x 2``	Fa. DISPOMED WITT oHG, Gelnhausen	-
Einmal-Küvette (1,5 ml, halbmikro)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	759015
Einmalspritze 2 ml	Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen	4606027V
Einmal-Sterilfilter, 0,22 µm PVDF	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P 6661
Gebrauchsfertige Filtereinheit Rotrand FP 30/0,2 CA-S	Fa. Schleicher & Schuell über Fisher Scientific GmbH, Nidderau	10462200
Gebrauchsfertige Filtereinheit, Gelbrand, Millex GV, 0,22 µl, 25 mm, PVDF-Membran	über Fisher Scientific GmbH, Nidderau	3422394
Gel-Blotting Papier GB 002	Fa. Schleicher & Schuell GmbH, Dassel	10426693
Kanülen, Sterican® (0,6 x 25 mm)	Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen	4657667
Mehrzweckgefäße, Schnappdeckel	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	203170
Microwell-Platten, 96-Loch, Flachboden	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	167008
Multipipettenspitzen 5-200µl	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	8156.1
Nitrocellulosemembran, Protran BA 85 Nitrocellulose Transfer Membran 0,45µm	Fa. Schleicher & Schuell GmbH, Dassel	10401196
Objektträger, geschnitten	Fa. IDL, Nidderau, über MAGV GmbH, Rabenau	3872872
PCR-Gefäße	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	04.022.1100
Petrischalen, steril	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	090310000

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Pipettenspitzen blau, gelb, kristall	Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen Mehrkanal 20-300µl, 2-200µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030000897
Plug-Mold (Gießförmchen)	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München	170-3706
Polysterol-Einmalpipetten, 1, 5, 10 ml	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	159609
PS-Röhrchen, Schnappdeckel 6, 15 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	203170
PS-Rührspatel	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4893.2
Reaktionsgefäß 1,5/2,0 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030120.086
Vorfilter Millex® GV	Fa. Millipore, über Fisher Scientific, Nidderau	3422407
Zellkultur-Flaschen 80 cm ²	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	17 8905

4 Verwendete Puffer und Medien

4.1 Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturtechniken

Collagen 10 % (10 ml) zum Beschichten

A. <i>dest.</i> autoklaviert	9,0 ml
Collagen R, rat tail (0,2 mg/ml)	1,0 ml

D-Sorbitol Lösung (2 %-ig)

HBSS ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺	500,0 ml
D-Sorbitol	10,0 g

Epithelzellen (EP)-Medium Stammlösung (100 ml)

DMEM + L-valin, GIBCO™	100,0 ml
D-(+)-Glucose-Lsg. (45_%)	378,0 µl
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1,0 ml
L-Glutamin	2,0 ml
Gentamicin	12,5 µl
Amphotericin B	1,0 ml
NEAA	1,0 ml
Insulin, bovines	100,0 µl
Hydrocortison	200,0 µl
Transferrin, bovines, GIBCO™	500,0 µl
Long™ EGF	15,0 µl

FITC (Fluorescein-Iso-Thiozyanat)-Phalloidin- Gebrauchslösung

FITC-Phalloidin (0,1 mg/ml in MeOH)	2,5 µl
PBS-Puffer Gebrauchslösung (1 x, pH 7,4)	47,5 µl

Fixierungsreagenz-Stammlösung (PFA-Lösung 4 %)

Paraformaldehyd (PFA)	4,0 g
PBS-Puffer-Gebrauchslösung	ad 100,0 ml

Fixierungsreagenz-Gebrauchslösung (PFA-Lösung 2 %)

Fixierungsreagenz-Stammlösung	500,0 µl
PBS-Puffer Gebrauchslösung	500,0 µl

Giemsa-Gebrauchslösung

Giemsa-Stammlösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung)	5,0 ml
PBS-Puffer oder A. dest.	45,0 ml
filtrieren	

Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (pH 7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
NaHCO ₃	0,35 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,06 g
D-(+)-Glucose	1,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

HEPES-Puffer Stammlösung (10 x, pH 7,4)

NaCl	80,0 g
HEPES	23,8 g
KCl	3,0 g
D-Glucose	20,0 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

HEPES-Puffer Gebrauchslösung (1 x, pH 7,4)

HEPES-Puffer Stammlösung (10 x, pH 7,4)	100,0 ml
<i>A. dest.</i>	900,0 ml

HEPES-Puffer + EDTA (0,1 %)

HEPES Stammlösung (10 x)	100,0 ml
Na ₂ -EDTA + 2 H ₂ O	1,0 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Mowiol-Mounting-Medium

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerin 87 %	6,0 g (4,918 ml)
<i>A. dest.</i>	6,0 ml
0,2 mTris (pH 8,6 mit HCL)	12,0 ml
pPD (p-Phenylendiamin)	je nach Ausbeute

MTT-Stammlösung (5 mg/ml)

MTT	0,50 g
PBS-Puffer Gebrauchslösung	100,0 ml

NaCl-Lösung (0,89 %)

NaCl	8,9 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

PBS-Stammlösung (10 x, pH 7,4)

NaCl	100,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18,0 g
KCl	2,5,0 g
KH ₂ PO ₄	2,5,0 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

PBS-Puffer Gebrauchslösung (1 x, pH 7,4)

PBS Stammlösung (10 x)	100,0 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

XI Anhang

Permeabilisierungsreagenz (Digitoninlösung 0,005 %)

Digitonin	0,005 g
PBS-Puffer Gebrauchslösung	ad 100 ml

SDS-Lösung (1 %-ig in NaCl)

Na-Dodecylsulfat	0,50 g
NaCl-Lösung (0,89_%)	50,0 ml

SDS-Lösung (10 %-ig, 0,01 n HCl)

Na-Dodecylsulfat	100,0 g
HCL 1N	10,0 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Transportlösung

PBS (1 x, pH 7,4)	500,0 ml
Penicillin/Streptomycin (100 x)	5,0 ml
L-Glutamin	10,0 ml
Amphotericin B	1,0 ml
Gentamicin	12,5 µl
D-(+)-Glucose, wasserfrei	1,0 g

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,2 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	ad 1000 ml

Trypsin-Gebrauchslösung (1 x)

Trypsin (10 x)	100,0 ml
HEPES-Puffer mit 0,1 % EDTA	900,0 ml

Verdaulösung

DMEM + L-valin, GIBCO™	60,0 ml
HBSS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	60,0 ml
L-Glutamin	1,2 ml
Pen/Strep	1,2 ml
Amphotericin B	25,0 µl
Gentamicin	15,0 µl
Collagenase 1 CLS	75,0 mg

Zellkulturmedium A = Epithelzellen-Medium + 10 % FKS

EP-Medium Stammlösung (steril)	100,0 ml
FKS	10,0 ml

Zellkulturmedium B = Epithelzellen-Medium + 2 % FKS + BPE

EP-Medium Stammlösung (steril)	100,0 ml
FKS	2,0 ml
BPE	500,0 µl

Zellkulturmedium C = Epithelzellen-Medium + 2 % FKS + BPE +1% D(+)-Mannose ohne Antibiotika

DMEM + L-valin, GIBCO™	100,0 ml
D-(+)-Glucose-Lsg. (45_%)	378,0 µl
L-Glutamin	2,0 ml
Amphotericin B	1,0 ml
NEAA	1,0 ml
Insulin, bovines	100,0 µl
Hydrocortison	200,0 µl
Transferrin, bovines, GIBCO™	500,0 µl
Long™ EGF	15,0 µl
FKS	2,0 ml
BPE	500,0 µl
D(+)-Mannose	1,0 g

Zellkulturmedium 1 = RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640 (mit stabilisiertem Glutamin)	890,0 ml
FKS	100,0 ml
Penizillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml

Zellkulturmedium 2 = RPMI 1640 + 20 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640 (mit stabilisiertem Glutamin)	790,0 ml
FKS	200,0 ml
Penizillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml

Zellkulturmedium 3 = RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % D(+)-Mannose

RPMI 1640 (mit stabilisiertem Glutamin)	890,0 ml
FKS	100,0 ml
D(+)-Mannose	10,0 g

4.2 Puffer und Lösungen für den ELISA

Waschpuffer-Gebrauchslösung

Waschpuffer-Konzentrat (20 x)	5 ml
<i>A.dest.</i>	95 ml

4.3 Puffer und Lösungen für die Tricine-PAGE

Anodenpuffer (pH 8,9)

Tris (0,1 M)	24,23 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
pH	ad 8,9

APS 10 %

APS (Ammoniumpersulfat)	10 %
in <i>A. dest.</i>	

Entfärbelösung

Essigsäure, 96 %-ig	10 %
in <i>A. dest.</i>	

Färbelösung

Essigsäure, 96 %-ig	10 %
Serva Blue G	25 mg/L
in <i>A. dest.</i>	

Fixierlösung

Ethanol	50 %
Essigsäure, 96 %-ig	10 %
in <i>A. dest.</i>	

Gelpuffer (nach Schägger/Jagow)

Tris-HCl 3M pH 8,4	200,0 ml
SDS	0,6 g
pH	ad 8,4

Kathodenpuffer (pH 8,25)

Tris (0,1 M)	24,23 g
Tricine (0,1 M)	35,84 g
SDS	2,0 g
<i>A. dest.</i>	ad 2000 ml
pH	ad 8,25

Polyacrylamidsammelgel (4 %-ig)

Gelpuffer	1,0 ml
Acrylamid-Lösung II (48/1,5)	350 µl
<i>A. dest.</i>	2,75 ml
APS (10 %-ig)	50,0 µl
TEMED	5,0 µl

Polyacrylamidtrenngel (10 %-ig)

Gelpuffer	5,0 ml
Glycerin ($\geq 87\%$)	2,0 ml (2,0 g)
Acrylamid-Lösung I (46,5/3)	3,0 ml
<i>A. dest.</i>	5,0 ml
APS (10 %-ig)	115,0 μ l
TEMED	11,5 μ l

Tricine-Probenpuffer

Tris (50 mM, pH 6,8)	
SDS	4 %
Glycerin	12 %
β -Mercaptoethanol	2 %
Serva Blue G	5 mg/L

Tris-HCl 3M pH 8,4

Tris	363,42 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
mit HCl-Lsg. pH einstellen	ad 8,4

4.4 Puffer und Lösungen für Western Blot und ImmunofärbungAmidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz	0,1 %
Methanol	45 %
Essigsäure 96 %	7 %
in <i>A. dest.</i>	

Amidoschwarz-Fixier/Entfärbelösung

Isopropanol	7 %
Essigsäure 96 %	5 %
in <i>A. dest.</i>	

Anodenpuffer 1

1 M Tris (ungepuffert)	300,0 ml
Methanol	200,0 ml
<i>A. dest.</i>	500,0 ml

Anodenpuffer 2

1 M Tris-Lösung (ungepuffert)	25,0 ml
Methanol	200,0 ml
<i>A. dest.</i>	770,0 ml

Blocking-Gebrauchslösung

ELISA Blocking Reagenz, gelöst in <i>A. dest.</i>	10 %
Ovines Serum	20 %
in PBS/Tween-Gebrauchslösung	

Chloronaphthol-Gebrauchslösung

Chloronaphthol-Stammlösung	2,0 ml
PBS-Gebrauchslösung	8,0 ml
H ₂ O ₂ (30 %-ig)	7,0 µl

Chloronaphthol-Stammlösung

3 mg Chloronaphthol	
Methanol 99 %	ad 1,0 ml

Kathodenpuffer

1 M Tris-Lösung (ungepuffert)	25,0 ml
Methanol	200,0 ml
<i>A. dest.</i>	770,0 ml
6-Aminocapronsäure	5,25 g

PBS-Puffer Gebrauchslösung (1x, pH 7,2)

PBS Stammlösung (10x)	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

PBS-Stammlösung (10 x, pH 7,2)

NaCl	100,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18,0 g
KCl	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

20 x PBS/Tween pH 7,2

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,0 g
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	9,4 g
NaCl	163,6 g
Tween 20	10,0 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
pH	ad 7,2

<u>1 x PBS/Tween pH 7,2</u>	
20 x PBS/Tween pH 7,2	100,0 ml
A. dest.	1900,0 ml
pH	ad 7,2

<u>1 M Tris-Lösung (ungepuffert)</u>	
Tris	121,14 g
A. dest.	ad 1000 ml

4.5 Puffer und Lösungen für CHEF-PFGE

<u>0,5 M Di-Natrium-EDTA-Lösung</u>	
Na ₂ -EDTA	186,12 g
A. dest.	ad 1000 ml
pH	ad 8,0

<u>ES-Puffer</u>	
0,5 M Di-Natrium-EDTA-Lösung pH 8.0	
N-Lauroylsarcosine Na-salz	1 %

<u>ESP-Puffer</u>	
ES-Puffer	
Proteinase K	0,65 mg/ml

<u>Ethidiumbromid-Lösung (4 mg/l)</u>	
Ebromid (1 %-ige Lösung = 10 mg/l)	200,0 µl
autoklaviertes A. dest.	ad 500,0 ml

<u>Lysepuffer-Gebrauchslösung</u>	
Lysepuffer-Grundlösung	
RNase A (2 mg/ml)	2,0 µg/ml
Lysozym (100 mg/ml)	1,0 mg/ml
Deoxycholinsäure Na-salz	0,2 %

<u>Lysepuffer-Grundlösung</u>	
NaCl-Lösung	1 M
Tris/Cl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	0,2 M
N-Lauroylsarcosine Na-salz	0,5 %
autoklavieren	

Lysozym-Gebrauchslösung

Lysozym	50,0 mg/ml
In autoklaviertem <i>A. dest.</i>	

Pett IV-Puffer

NaCl-Lösung	1 M
Tris/Cl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
pH	ad 8,0
autoklavieren	

PMSF-Stammlösung (100 mM)

PMSF	100 mM
in Isopropanol	

PMSF-Gebrauchslösung (1,5 mM)

PMSF-Stammlösung	30 µl
TE-Puffer pH 8,0	2 ml

0,5 x TBE

10 x TBE	100,0 ml
autoklaviertes <i>A. dest.</i>	1900 ml

0,5 x TBE mit 100µM Thioharnstoff

0,5 x TBE	1800 ml
Thioharnstoff-Stocklösung	1,8 ml

TE-Puffer

EDTA pH 8,0	0,1 mM
Tris/Cl pH 8,0	10,0 mM
pH	ad. 8,0
autoklavieren	

10 x TBE (autoklaviert)

Tris	108,0 g
Borsäure	55,0 g
0,5 M EDTA pH 8.0	40 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Thioharnstoff-Stocklösung (100 mM)

Thioharnstoff	76,12 mg
autoklaviertes <i>A. dest.</i>	ad 10 ml

1 M Tris HCL-Lösung

Tris	121,1 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
HCL	ad pH 8,0
pH	ad 8,0

4.6 Puffer und Lösungen für PCRsElektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (1 x TAE)

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)	200,0 ml
<i>A. dest.</i>	ad 10 L

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris	242,0 g
Eisessig	57,10 g
0,5 M Na-EDTA x 2H ₂ O pH 8.0	100,0 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Ladepuffer (10 x)

Bromphenolblau (Na-Salz)	0,25 g
Xylene Cyanole FF	0,25 g
Glycerin	30,0 g
autoklaviertes <i>A. dest.</i>	100 ml
aliquotiert (1 ml), Lagerung bei -20 °C	

4.7 Kulturmedien für die BakterienanzuchtGassner Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar)

Gassner-Nährboden (Basis)	77,0 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Luria-Bertani-(LB-) Medium

Trypton	10,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
NaOH 1 N	pH ad 8,2

Schafblutagar (BAP)

Blut-Agar (Basis)	50,0 g
defibriniertes Schafblut	50,0 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

XII Abbildungsverzeichnis

1 Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung des Studiendesigns.....	42
Abb. 2: Hypothetischer Kurvenverlauf nach einer log ₁₀ -Titration von Stx.....	51
Abb. 3: Tricine-PAGE von Stx1	62
Abb. 4: Nachweisgrenze der <i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR	68
Abb. 5: <i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR, Nachweis von DNS inaktivierter Keime	69
Abb. 6: Nachweisgrenze der <i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs	72
Abb. 7: Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) im Serum der Muttertiere	86
Abb. 8 Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) im Kolostrum der Muttertiere	87
Abb. 9: Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) in der Milch der Muttertiere	87
Abb. 10: Titer Stx1-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Stx1Ak) im Serum neugeborener Kälber	88
Abb. 11: Verlauf der Stx1Ak-Titer aller Kälber bis zur 24. Lebenswoche	90
Abb. 12: Titer Stx1-spezifischer neutralisierender Antikörpern im Serum von über 6 Monate alten Tieren.....	91
Abb. 13: Titer Stx2-spezifischer neutralisierender Antikörper (Stx2Ak)	93
Abb. 14: Nachweis Stx1-spezifischer Serumantikörper im kompetitiven ELISA.....	95
Abb. 15: Nachweis Stx2-spezifischer Antikörper im kompetitiven ELISA	96
Abb. 16: Nachweis Stx1-spezifischer Antikörper im Western Blot/Immunofärbung	98
Abb. 17: Ergebnisse der <i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR in Kotproben von Kälbern und Muttertieren	101
Abb. 18: <i>stx</i> -ausscheidende Kälber verschiedener Altersstufen	102
Abb. 19: <i>stx1</i> - bzw. <i>stx2</i> -ausscheidende Kälber verschiedener Altersstufen	103
Abb. 20: Ergebnisse der <i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs in Kotproben von Kälbern und Muttertieren	105
Abb. 21: Jahreszeitliche Verteilung <i>stx</i> -positiver Kälberkotproben	108
Abb. 22: Für die Isolation von STEC-Stämmen herangezogene Kotproben	110

Abb. 23: Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) von Kontrollstamm EDL933 sowie 11 STEC-Isolaten	112
Abb. 24: FAS-Test mit HEp2(Clone2b)-Zellen, positive Reaktion.....	115
Abb. 25: Giemsa-Test mit HEp2(Clone2b)-Zellen, adherente bovine STEC-Stämme	117
Abb. 26: FAS-Test mit bovinen Kolonkryptenzellen, positive Reaktion	118
Abb. 27: Giemsa-Test mit bovinen Kolonkryptenzellen, adhärenste bovine STEC-Stämme.	120

2 Tabellen

Tab. 1: Stx2-Varianten, Nomenklatur und Referenzstämme	6
Tab. 2: STEC-Prävalenzen bei Rindern in Europa	11
Tab. 3: STEC-Prävalenzen bei Rindern außerhalb Europas	13
Tab. 4: Studien zur bovinen STEC-spezifischen humoralen Immunität bei natürlichen STEC- Infektionen	23
Tab. 5: Studien zur bovinen STEC-spezifischen humoralen Immunität bei experimentellen STEC-Infektionen	24
Tab. 6: Studien zur bovinen STEC-spezifischen humoralen Immunität nach Immunisierung mit STEC-Antigen.....	26
Tab. 7: Zur Herstellung von Ultraschall-Lysaten verwendete <i>E. coli</i> -Stämme, Eigenschaften und Herkunft	56
Tab. 8: Im Vero-ZT ermittelte CD ₅₀ /ml der <i>E. coli</i> Ultraschall-Lysate	58
Tab. 9: <i>stx1/stx2</i> -Multiplex-PCR, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	65
Tab. 10: Für die <i>stx1/stx2</i> -Multiplex PCR verwendete Oligodesoxyribonukleotide	66
Tab. 11: <i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes.....	70
Tab. 12: <i>stx2</i> -Typisierungs-PCRs, verwendete Oligodesoxyribonukleotide	70
Tab. 13: <i>E. coli</i> -Kontrollstämme.....	71
Tab. 14: Multiplex-PCR für <i>stx</i> , <i>ehxA</i> , <i>eae</i> ; Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	74
Tab. 15: Multiplex-PCR für <i>stx</i> , <i>ehx</i> , <i>eae</i> ; verwendete Oligodesoxyribonukleotide	74
Tab. 16: Multiplex-PCR für <i>stx</i> , <i>ehx</i> , <i>eae</i> ; Zusammensetzung des Multiprimermix	75
Tab. 17: CHEF-PFGE; Laufbedingungen	78
Tab. 18: Zur Durchführung von Adhäsionstests verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	79
Tab. 19: Durchführung der Zell-Adhäsionstests mit bovinen Kolonkryptenzellen.....	83
Tab. 20: Stx1-spezifische Antikörper im Serum von Kälbern und Muttertieren	99

Tab. 21: Anzahl <i>stx</i> -positiver und -negativer Kälberkotproben in den einzelnen Kalendermonaten	106
Tab. 22: Eigenschaften der isolierten STEC-Stämme.....	111
Tab. 23: Ergebnisse der Restriktionsmusteranalyse der STEC-Isolate.....	113
Tab. 24: Bindungsversuche mit HEp2(Clone2b)-Zellen; Adhäsionstest	116
Tab. 25: Bindungsversuche mit bovinen Kolonkryptenzellen, Adhäsionstest.....	119
Tab. 26: Vero-Zytotoxizität von Zellkulturüberständen boviner Kolonkryptenzellen aus Adhäsionstests	121
Tab. 27: Übersicht Muttertiere	161
Tab. 28: Übersicht Kälber	162
Tab. 29: weitere untersuchte Tiere	163
Tab. 30: Einzelwerte StxAk-Titer (Verozell-Neutralisationstest), Proben der Muttertiere ...	165
Tab. 31: Einzelwerte Stx1Ak-Titer (Verozell-Neutralisationstest) im Serum von Kälbern ..	166
Tab. 32: Einzelwerte Stx2Ak-Titer (Verozell-Neutralisationstest) im Serum von Kälbern ..	167
Tab. 33: Einzelwerte StxAk-Titer (Verozell-Neutralisationstest), Proben weiterer Tiere.....	168
Tab. 34: Einzelwerte relIHOD (kompetitiver ELISA) überprüfter Kälberseren gegen Stx1. 169	
Tab. 35: Einzelwerte relIHOD (kompetitiver ELISA) überprüfter Kälberseren gegen Stx2. 170	
Tab. 36: Einzelwerte relIHOD (kompetitiver ELISA) überprüfter Kälberseren gegen Stx2c171	
Tab. 37: Verwendete Geräte.....	172
Tab. 38: Verwendete Chemikalien.....	173
Tab. 39: Verwendetes Verbrauchsmaterial	177

Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Christian Menge bedanke ich mich ganz herzlich für die Konzeption und Betreuung der Arbeit. Sein unglaubliches Wissen, seine Ideen und Hilfestellungen bei allen Fragen rund um die Arbeit sowie die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit schätze ich außerordentlich.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes, der zur Durchführung der Arbeit notwendigen Mittel, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft bei der Darstellung und Interpretation der Ergebnisse.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ sowie den Sprechern des Kollegs, Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger und Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind für die hervorragende Organisation dieser wertvollen Institution, die mir über die Doktorarbeit hinaus einen Einblick in unzählige Themengebiete und Arbeitsmethoden ermöglicht hat und zudem ein außerordentlich fruchtbares wissenschaftliches und menschliches Umfeld mit sich brachte.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Georg Erhardt sowie Herrn Dipl.-Ing. Arne Bodenbender für die Zusammenarbeit auf der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik sowie ihren Mitarbeitern, die mir bei der Entnahme der Proben zu jeder Tages- und Nachtzeit stets freundlich zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Herrn Axel Brandt für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Frau Dr. Melanie Mohr hat mich nicht nur in die Arbeitsabläufe der Zellkultur eingewiesen, sondern war mir vor allem eine unschätzbare Hilfe bei der fast zwei Jahre andauernden wöchentlichen Probenentnahme. Ihr danke ich für die Zusammenarbeit und die gute Freundschaft, die sich daraus entwickelt hat.

Frau Gabriele Köpf danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Methoden sowie für die geduldige Einarbeitung in sämtliche molekularbiologische Techniken, für ihre Freundschaft und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Doktoranden hat.

Für ihre helfende Hand im Zellkulturlabor sei Frau Ursula Leidner gedankt, für seine Hilfe bei der Isolation der STEC-Stämme bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Hakan Bulun.

Bei Frau Dr. Stefanie Barth möchte ich mich für ihre Hilfe bei den PCR-Methoden sowie für ihre Geduld bei der Beantwortung zahlreicher Fragen rund um die Doktorarbeit bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Helge Karch und Frau Dr. Martina Bielaszewska vom Institut für Hygiene in Münster für die freundliche Überlassung des aufgereinigten Shigatoxins sowie Herrn Dr. Amir Abdulmawjood vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde für die Bestimmung der Intimin-Varianten.

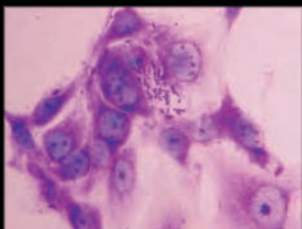
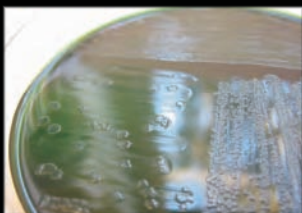
Allen Mitarbeitern des Institutes und Doktoranden sei für den, wie ich finde, außergewöhnlich netten Umgang und die freundschaftliche Atmosphäre gedankt, die sich mit Sicherheit positiv bei der Anfertigung dieser Arbeit ausgewirkt haben.

Auch Frau Dr. Ivonne Stamm soll an dieser Stelle erwähnt werden. Sie war es, die mir während meiner Studentenzeit die Mikrobiologie schmackhaft und eine Promotion in diesem Institut ans Herz gelegt hat – dafür ein herzliches Dankeschön.

Danken möchte ich schließlich auch meiner Familie und meinen Freunden, vor allem meinen Eltern Albrecht und Sabine Fröhlich, die meine Entscheidungen stets unterstützten und deren Vertrauen in mich keine Grenzen kennt. Danke sagen möchte ich auch meiner Oma Gisela Fröhlich, die die berufliche Karriere ihrer Enkelkinder begleitet und unterstützt wie kaum eine andere Person.

Der größte Dank jedoch gebührt meinem Ehemann Thomas Oeckel. Lieber Thomas, Du bedeutest mir mehr als alles andere auf dieser Welt. Danke für Deine Liebe, Deine Zuneigung und Dein Vertrauen in mich. Danke für die gemeinsame Zeit, die glücklichste meines Lebens.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition wissenschaft

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5387-7

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 195387 1